

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von:

Diplom-Biologin Katja Simon-Keller

aus: Idar-Oberstein

Tag der mündlichen Prüfung:.....

**CHARAKTERISIERUNG VON RHABDOMYOSARKOMEN UND
ETABLIERUNG EINER ADOPTIVEN T-ZELLTHERAPIE AUF DER
GRUNDLAGE CHIMÄRER T-ZELLEN**

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Viktor Umansky
Prof. Dr. med. Alexander Marx

den Kindern, die gegen diese Krankheit kämpfen

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ZUSAMMENFASSUNG	IX
SUMMARY	XI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Rhabdomyosarkome	1
1.1.1 Embryonale Rhabdomyosarkome	2
1.1.2 Alveoläre Rhabdomyosarkome	4
1.2 RMS und muskuläre Differenzierung	6
1.2.1 Differenzierung normaler Skelettmuskulatur	6
1.2.2 Expression skelettmuskelspezifischer Gene in RMS	7
1.3 Immunologische Aspekte der Tumorentstehung und Tumorabwehr bei RMS und anderen Tumoren	8
1.3.1 Die Rolle des Immunsystems bei der Entstehung und Progression nicht-rhabdomyomatöser Tumore	8
1.3.2 Die Rolle immunsupprimierender Mechanismen bei der Tumorabwehr und Therapieresistenz	23
1.3.3 Skelettmuskulatur als immunologisches System	24
1.4 Immuntherapeutische Ansätze – allgemeine Übersicht	25
1.5 Konventionelle und immuntherapeutische Ansätze bei RMS	29
1.5.1 Tumorantigen bei RMS	30
1.6 Ziele der Arbeit	31
2 MATERIAL UND METHODEN	33
2.1 Materialien	33
2.1.1 Antikörper	33
2.1.2 Zytokine	35
2.1.3 Kits	35
2.1.4 Transfektionsreagenzien	35
2.1.5 Zelllinien	36

2.1.6	Zellkulturmedien und –reagenzien.....	36
2.1.7	Mikroorganismen	37
2.1.8	Plasmide	37
2.1.9	Primer.....	37
2.1.10	siRNA	40
2.1.11	Molekulargewichtsmarker.....	40
2.1.12	Sonstige Reagenzien	41
2.2	Methoden.....	42
2.2.1	Kultivierung von Bakterien.....	42
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	43
2.2.3	Kultivierung von Säugerzellen.....	49
2.2.4	Transfektion von Säugerzelllinien	51
2.2.5	Transduktion von Säugerzellen.....	54
2.2.6	Zytotoxizitätstest.....	55
2.2.7	ELISA (<i>enzyme linked immunosorbant assay</i>)	57
2.2.8	Durchflusszytometrische Analysen.....	57
2.2.9	Proteinbiochemische Methoden	58
2.2.10	RNA Isolierung und Verarbeitung	62
2.2.11	Färbungen	64
3	ERGEBNISSE	66
3.1	Vorarbeiten	66
3.2	Erzeugung verbesserter membranständiger CAR gegen den fAChR	67
3.2.1	Expression des Target-Antigens auf der Oberfläche von RMS-Zellen	68
3.2.2	Expression der CAR auf Effektor-T-Zellen	70
3.2.3	Aktivierungsstatus von PBLs und chimären T-Zellen	71
3.2.4	Funktionalität des CAR abhängigen Signalwegs in chimären T-Zellen	72
3.2.5	Nachweis der Spezifität des CAR gegenüber fAChR	72
3.3	Interaktion von chimären T-Zellen und NKT-Zellen mit RMS-Zellen	74
3.3.1	Zytotoxizität chimärer T-Zellen gegenüber fAChR-exprimierenden Zellen.....	74
3.3.2	Zytotoxizität chimärer NKT-Zellen gegenüber fAChR-exprimierenden Zellen.....	77
3.4	Expression immunrelevanter Oberflächenmoleküle bei RMS	79
3.4.1	Expression von MHC-Molekülen	80
3.4.2	Expression kostimulatorischer Moleküle	83
3.4.3	Expression von Adhäsionsmolekülen bei RMS	85
3.4.4	Expression inhibitorischer Oberflächenmoleküle bei RMS	91
3.4.5	Zusammenfassung der bei RMS-Zelllinien und Geweben exprimierten immunologischen Oberflächenmoleküle	94

3.5	Einfluss von IFNγ auf RMS-Zelllinien	95
3.5.1	IFN γ -„response“-Gene	96
3.5.2	IFN γ -abhängige Apoptose-Stimulation bei RMS-Zelllinien.....	98
3.5.3	Der IFN γ -Signaltransduktionsweg bei RMS.....	100
3.5.4	Regulierung von IFN γ -Target-Genen auf transkriptioneller Ebene	101
3.5.5	SOCS-1	102
3.5.6	Epigenetische Mechanismen	103
3.6	Apoptose-Mechanismen bei RMS	104
3.6.1	Extrinsische Apoptoseregulation bei RMS-Zelllinien	105
3.6.2	Expression von apoptotisch relevanten Proteinen der intrinsischen Apoptoseregulation bei RMS ..	108
3.7	<i>In-vivo</i>-Mausexperimente	120
4	DISKUSSION	123
4.1	Hintergrund, Ziel und Strategie der Arbeit.....	123
4.2	Verbesserung vorbekannter chimärer T-Zellen mit fAChR-Spezifität.....	124
4.3	Vergleich von chimären T-Zellen und NKT/CIK-Zellen.....	126
4.4	Resistenzmechanismen von RMS-Zellen gegenüber chimären T-Zellen.....	127
4.4.1	MHC, Kostimulatoren und immunsupprimierende Oberflächenmoleküle	128
4.5	Resistenzmechanismen, die die Apoptose-Induktion bei RMS beeinträchtigen können.....	133
4.5.1	IFN γ	133
4.5.2	Resistenz von RMS gegenüber extrinsischer Apoptose-Induktion durch Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie	134
4.5.3	Resistenz von RMS gegenüber intrinsischer Apoptose-Induktion.....	136
4.5.4	Survivin.....	137
4.6	<i>In-vivo</i>-Mausexperimente	138
4.7	Zusammenfassung und Ausblick	140
5	LITERATUR	144
6	ANHANG	167
6.1	Vektorkarten.....	167
6.2	Gewebeproben	168

6.3	Nachweis der Pax3-FKHR Translokation.....	169
6.4	Chemikalienliste	169
6.5	Geräteliste	170
VERÖFFENTLICHUNGSNACHWEIS.....		172
DANKSAGUNG		174

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5' Aza	5-Aza-2'-deoxycytidin
μ	mikro (10 ⁻⁶)
APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
ARMS	alveoläres Rhabdomyosarkom
bp	Basenpaare (<i>base pair</i>)
BSA	bovines Serumalbumin
CAR	chimärer Antigenrezeptor (<i>chimeric antigen receptor</i>)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CIK	Zytokin-induzierte Killerzellen (<i>cytokine-induced killer cells</i>)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (<i>cytotoxic T-lymphocytes</i>)
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser (<i>aqua bidest</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
dsDNA	doppelsträngige DNA
EC	Extrazelluläre Domäne
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERMS	embryonales Rhabdomyosarkom
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometer (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FBS	fetales Bovines Serumalbumin
Fc	<i>Fragment cystallizable</i>
fwd	<i>forward</i> Primer (5' → 3' Primer)
g	Gramm

<i>g</i>	Erdbeschleunigung
<i>h</i>	Stunde (<i>hour</i>)
HADAC	Histon-Deacetylase-Inhibitor
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IAP	<i>inhibitor of apoptosis</i>
IC	Intrazelluläre Domäne
IFN γ	Interferon gamma
IHC	immunhistochemische Färbung (<i>immunohistochemistry</i>)
IL	Interleukin
M	Molar
mA	Milliampere
MEM	<i>minimal essential medium</i>
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minuten
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NaOH	Natriumhydroxid
NEA	nicht essentielle Aminosäuren (<i>non essential amino acids</i>)
n	nano (10^{-9})
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
p	pico (10^{-12})
pH	<i>potentia hydrogenii</i> – negativer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration in wässrigen Lösungen
PI	Propidiumiodid
qRT-PCR	quantitative-PCR (<i>quantitative Real Time PCR</i>)
rev	<i>reverse</i> Primer (3' \rightarrow 5' Primer)
RMS	Rhabdomyosarkom

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RQ	relative Quantifizierung (<i>relative quantification; fold change</i>)
RT	Raumtemperatur
s-CD54	lösliches (<i>soluble</i>) CD54
<i>scFv</i>	<i>single chain</i> -Fragment (variable Antikörperregion)
scr	<i>scrambled</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunden
siRNA	<i>silencer</i> -RNA
TAA	Tumorantigen (<i>tumor associated antigen</i>)
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TEMED	N, N, N', N' Tetramethylethyldiamin
TIL	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TM	Transmembrandomäne
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Units</i>
UE	Untereinheit
V	Volt
WT	Wildtyp

Abkürzungsverzeichnis Aminosäuren

Ala	A	Alanin	Leu	L	Leucin
Arg	R	Arginin	Lys	K	Lysin
Asn	N	Asparagin	Met	M	Methionin
Asp	D	Asparaginsäure	Phe	F	Phenylalanin
Cys	C	Cystein	Pro	P	Prolin
Gln	Q	Glutamat	Ser	S	Serin
Glu	E	Glutaminsäure	Thr	T	Threonin
Gly	G	Glycin	Trp	W	Tryptophan
His	H	Histidin	Tyr	Y	Tyrosin
Ile	I	Isoleucin	Val	V	Valin

Abkürzungsverzeichnis DNA Basen

A	Adenin
C	Cystein
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

ZUSAMMENFASSUNG

Rhabdomyosarkome (RMS) sind die häufigsten Weichgewebetumoren bei Kindern und Jugendlichen. Obwohl die 5-Jahres-Überlebensrate bei lokalisierten RMS heute 70% erreicht, ist die Überlebensrate bei metastasierten RMS gering. Diesen Risikopatienten eröffnen sich neue Perspektiven durch immuntherapeutische Strategien. Die Entwicklung des adoptiven Transfers RMS-reaktiver chimärer T-Zellen steht im Zentrum der vorliegenden Arbeit.

In Voruntersuchungen wurden chimäre Antigenrezeptoren (CAR) mit Spezifität für ein RMS-spezifisches Antigen, den fetalen Acetylcholinrezeptor (fAChR), generiert. Die retrovirale Expression dieses CAR auf der Oberfläche von Blutlymphozyten erzeugt chimäre T-Zellen, die fAChR-exprimierende RMS-Zellen *in vitro* und *in vivo* erkennen. CAR der ersten Generation, die aus dem scFv-Fragment eines humanen fAChR-spezifischen Autoantikörpers, einer IgG- und einer CD3 ζ -Domäne bestehen, erzeugen in chimären T-Zellen jedoch eine zu geringe zytolytische Aktivität, um ihren Einsatz *in vivo* zu rechtfertigen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher der CAR der ersten Generation mit einer zusätzlichen CD28-Signaldomäne ausgestattet, um fehlende kostimulatorische Signale zu kompensieren und die Anergisierung chimärer Zellen zu verhindern. Diese Rezeptor-Modifikation steigerte die lytische Aktivität der chimären Zellen signifikant, blieb jedoch im Vergleich zu CEA-spezifischen CAR bei Colon-Karzinomzellen unbefriedigend.

Die anschließende Analyse potenzieller Resistenzmechanismen zeigte, dass essentielle kostimulatorische Oberflächenmoleküle auf RMS fehlen, während Inhibitoren der Tumor-T-Zell-Interaktion, wie B7H1 und B7H3, von RMS verstärkt exprimiert werden. Des Weiteren erwies sich die Expression von Adhäsionsmolekülen für die Effektivität chimärer Effektorzellen als relevant, da die CD54-Neoexpression auf mehreren primär CD54-negativen RMS-Zelllinien die Zytotoxizität chimärer T- und CIK-Zellen *in vitro* signifikant steigerte.

Als Weitere, teilweise RMS-Zelllinien-spezifische, potenzielle Resistenzmechanismen wurden stark verminderte Sensitivitäten gegenüber IFN γ , TNF α , FAS-L und teilweise TRAIL gefunden. Außerdem zeigten RMS-Zelllinien und RMS-Gewebe eine starke Überexpression von Mitgliedern der *inhibitor of apoptosis* (IAP)-Familie, die in die T-Zell-induzierte Apoptose eingreifen. Die siRNA vermittelte oder pharmakologische Hemmung von überexprimierten IAPs verbesserte die Zytotoxizität chimärer T-Zellen gegenüber RMS-Zellen signifikant.

Erste Versuche mit immundefizienten NOD/SCID-Mäusen zeigten, dass die einmalige Gabe fAChR-reaktiver chimärer T-Zellen das Wachstum von RMS-Xenotransplantaten verlangsamen, die Tumorzellen aber nicht eradizieren konnte. Zukünftige *In-vivo*-Experimente haben daher das Ziel, die Ausschaltung der neu entdeckten Resistenzmechanismen mit der wiederholten Gabe verbesserter chimärer T-Zellen zu verbinden, um die Effizienz des adoptiven Transfers RMS-spezifischer chimärer T-Zellen zu steigern.

SUMMARY

Rhabdomyosarcoma is the most common soft tissue malignancy of childhood and adolescence. Despite improved 5-year overall survival rates that now reach 70% in patients with localized tumours, outcome of children with advanced RMS is still poor. Immune therapeutic options offer new perspectives for high-risk patients. Design of an adoptive immune therapy using RMS specific chimeric T cells was the objective of this work.

To explore an immune cell anti-tumour approach, we redirected cytotoxic T cells towards RMS cells by a chimeric antigen receptor (CAR) with specificity for the foetal acetylcholine receptor (fAChR), which is a specific tumour associated antigen expressed on RMS. These chimeric T cells should be able to recognize and kill fAChR⁺ RMS cells *in vitro* and *in vivo*.

However, chimeric T cells expressing a previously generated CAR, consisting of a scFv fragment (made from an fAChR specific antibody), an IgG hinge region and a CD3 ζ signal transduction domain, showed attenuated killing, which appeared insufficient for *in vivo* use.

In this work we generated an improved chimeric receptor by adding a costimulatory CD28 domain to compensate for missing costimulatory signals and avoid induction of T cell anergy. Chimeric T cells expressing the modified CAR showed enhanced RMS tumour cell lysis, but were markedly attenuated in comparison to killing of CEA expressing colon carcinoma by CEA-specific chimeric T cells.

Analysis of costimulatory and immunosuppressive surface molecules, crucial factors of tumour cell-T cell interaction, revealed failure of RMS to express essential costimulators; instead, expression of inhibitory molecules, like B7H1 and B7H3, was observed. It was also shown that adhesion molecules influence the effect of chimeric T cells: induced over-expression of the adhesion molecule CD54 by RMS cells strongly increased their susceptibility to chimeric T cells and CIK cells. We found also a reduced sensitivity of RMS against IFN γ , TNF α , FAS-L and partially TRAIL, which are potential cell line-specific resistance mechanisms. Of particular interest was the strong over-expression of *inhibitor of apoptosis (IAP)* family members in RMS cells and tissue, since IAPs interfere with T cell mediated apoptosis induction. Consequently, inhibition of IAPs through specific siRNA or pharmacological substances improved killing efficiency by chimeric T cells.

Treatment of RMS bearing NOD/SCID mice with fAChR specific chimeric T cells revealed delayed tumour development but no definitive eradication. Future *in vivo* experiments want to combine blockade of the discovered resistance mechanisms in RMS with application of improved chimeric T cells, to develop new therapeutic options for RMS patients.

1 EINLEITUNG

1.1 Rhabdomyosarkome

Rhabdomyosarkome (zusammengesetzt aus dem griechischen: rhabdos, der Stab; mys, der Muskel; sárx, das Fleisch) sind Weichgewebstumore, die vorwiegend im Kindes- und Jugendalter auftreten. Nach Tumoren des Zentralen Nervensystems, Lymphomen und Neuroblastomen stellen Weichgewebstumore mit ca. 7% die vierthäufigste pädiatrische maligne Erkrankungsgruppe dar¹. Davon machen Rhabdomyosarkome (RMS) mit rund 60% den größten Anteil aus (Abbildung 1.1)^{2 3}. Das Durchschnittsalter bei der Diagnose eines RMS liegt bei 5 Jahren mit einer Inzidenzrate von 5,3 Kindern/Million Kinder⁴.

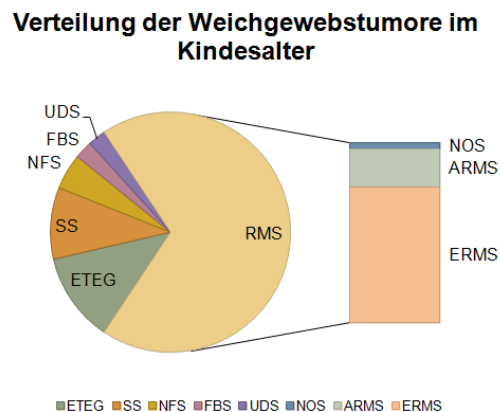


Abbildung 1.1: Übersicht über die prozentuale Verteilung von Weichgewebssarkomen im Kinder- und Jugendalter (www.Kinderkrebsinfo.de; Koscielniak E.); RMS - Rhabdomyosarkom, ETEG - extraossäre Tumore der Ewing Gruppe, SS - Synovialsarkom, NFS - Neurofibrosarkome, FBS - Fibrosarkome, UDS - undifferenzierte Sarkome, ARMS - alveoläres Rhabdomyosarkom, ERMS - embryonales Rhabdomyosarkom, NOS - nicht weiter spezifiziert (*not otherwise specified*).

Als Ausgangszellen von RMS werden überwiegend mutierte mesenchymale Stammzellen vermutet, obwohl der genaue zelluläre Ursprung der meisten Weichteiltumoren bisher nicht bekannt ist^{5 6}. Andererseits werden aufgrund der skelettmuskulären Differenzierung von RMS auch myogene Vorläuferzellen erwogen⁷. Für einen mesenchymalen Ursprung spricht insbesondere die Beobachtung, dass RMS nicht auf die Skelettmuskulatur begrenzt sind, sondern auch in Geweben vorkommen, die keinerlei skelettmuskuläre Differenzierung aufweisen. Die Primärtumore findet man vorwiegend im Kopf- und Halsbereich (ca. 35%), an den Extremitäten (ca. 19%) und im Urogenitaltrakt (ca. 26%) (Abbildung 1.2)⁸⁻¹⁰.

Verteilung von RMS auf Körperregionen

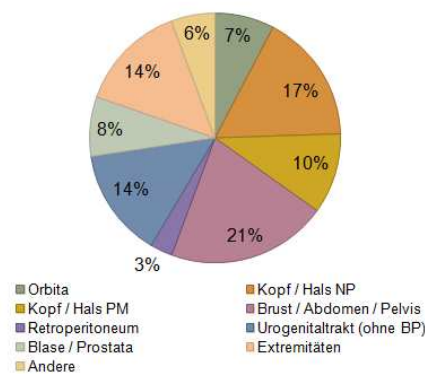


Abbildung 1.2: Frequenz der Lokalisation des Primärtumors bei Kindern und jungen Erwachsenen mit Rhabdomyosarkom nach Sultan *et al.*¹⁰; NP = nicht parameningeal, PM = parameningeal, BP = Blase/Prostata.

Histologisch stellen sich RMS je nach Subtyp (Abschnitte 1.1.1 und 1.1.2) entweder als spindelzellige oder als klein- und rundzellige Tumore mit Expression muskeltypischer Differenzierungsgene, wie MyoD, Myogenin, Desmin und Aktin, dar^{11 12}. Bei Kindern und Jugendlichen kommen praktisch nur zwei histologische Subtypen (embryonale und alveoläre RMS) vor, die sich hinsichtlich Genetik und Prognose unterscheiden. Bei Erwachsenen beobachtet man zusätzlich sog. pleomorphe RMS, die aber so selten sind, dass sie in dieser Arbeit nicht weiter behandelt wurden.

1.1.1 Embryonale Rhabdomyosarkome

Embryonale Rhabdomyosarkome (ERMS) machen mit rund 80% den größten Teil der diagnostizierten Rhabdomyosarkome aus und weisen mit einer krankheitsfreien 5-Jahres-Überlebensrate von 70 - 95% eine weitaus bessere Prognose auf, als die frühzeitig und häufig ausgedehnt metastasierenden alveolären RMS (ARMS)^{13 14}. Obwohl RMS, wie oben erwähnt, in nahezu jeder Körperregion auftreten können, findet man ERMS besonders im Bereich von Augenhöhle (Abbildung 1.3), Kopf- und Halsregion sowie im Bereich des Urogenitaltraktes¹¹.



Abbildung 1.3: Orbitales ERMS; die Aufnahme zeigt einen Tumor, der supra-medial in der linken Augenhöhle liegt und das Auge nach kaudal und lateral verschiebt. Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Liddy Shriver Sarkom Initiative, www.SarcomaHelp.com, Wexler L.H., 2004.

Histologisch ähneln ERMS Muskelzellen in frühen Stadien der embryonalen Myogenese. Dabei können histologisch dichte von weniger dichten Zellzonen abgegrenzt werden, die oftmals von losem myxoidem Stroma durchsetzt sind^{12 15}.

ERMS sind durch eine genetische Instabilität mit zahlreichen Funktionsverlusten und -zugewinnen (*losses and gains of functions*) gekennzeichnet^{7 9}. Bei Erkrankungen, die ähnliche genetische Instabilitäten aufweisen, ist die Entwicklung von ERMS-Tumoren nicht selten. Bekanntes Beispiel hierfür ist das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS), ein genetisch bedingtes Großwachstum, das durch eine Überexpression von IGF2 entsteht und zu vermehrter Tumorgenese führt¹⁶. Tatsächlich konnte eine verstärkte Expression von IGF2 auch bei ERMS nachgewiesen werden. Bedingt wird die Überexpression durch Mutationen einer kleinen Region auf dem kurzen Arm von Chromosom 11, die dem IGF2/H19 Lokus (11p15.5) entspricht.

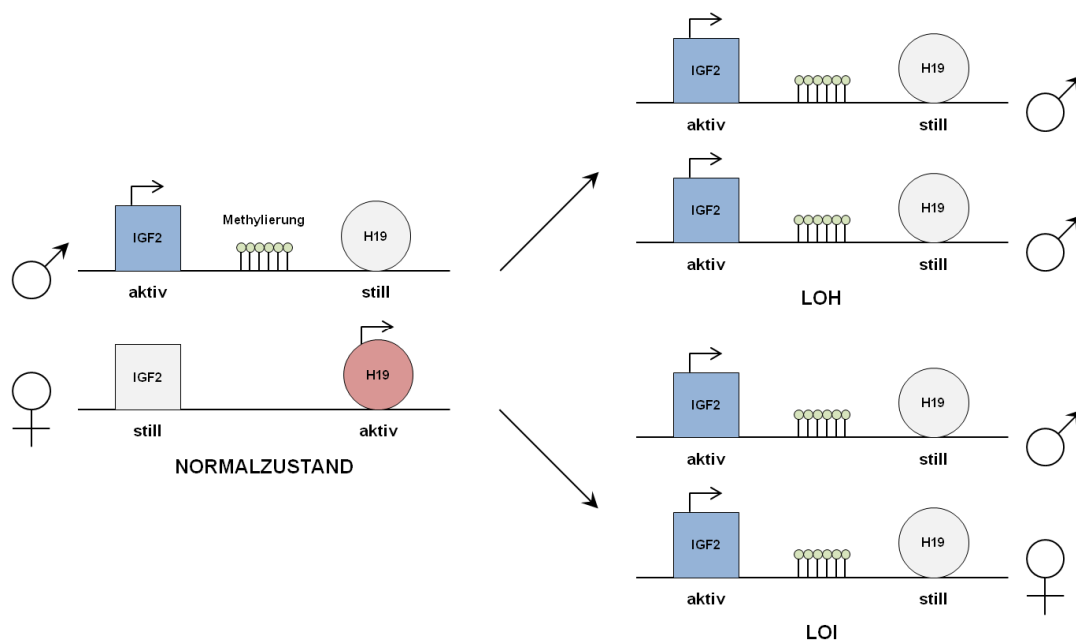


Abbildung 1.4: Model des Imprinting Verlustes von IGF2 und H19 bei BWS bzw. ERMS. In normalen Zellen wird IGF2 paternal und H19 maternal exprimiert. Kontrolliert wird die Expression über die Methylierung eines Promotorbereiches *upstream* von H19 infolge dessen die Expression von H19 unterdrückt wird¹⁷; LOH – *loss of heterozygosity* (z.B. uniparentale Disomie), LOI – *loss of imprinting*. Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Macmillan Publishers Ltd: Nature Genetics; Steenman *et al.*; 1994.

Die IGF2/H19-Region wird durch Methylierung reguliert was dazu führt, dass H19 lediglich vom maternalen Allel und IGF2 nur vom paternalen Allel abgelesen wird (Abbildung 1.4). Bei einem Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*, LOH), durch die Vererbung beider Chromosomen vom Vater (uniparentale Disomie), oder einem Verlust des Imprintings (*loss of imprinting*, LOI), in dessen Verlauf die Expression von IGF2 auch vom maternalen Allel stattfindet, wird IGF2 vermehrt exprimiert (Abbildung 1.4)^{11 16 18}. Da die Stimulation von Zellen mit IGF2 zu verstärkter Proliferation, Tumordinvasion, Angiogenese und Apoptosehemmung führt¹⁹, wird der Überexpression von IGF2 eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von ERMS zugeschrieben¹⁶.

1.1.2 Alveoläre Rhabdomyosarkome

Die zweithäufigste Subgruppe der RMS bilden mit ca. 20% die alveolären RMS (ARMS). ARMS weisen eine höhere Metastasierungsrate als ERMS auf, was zu der geringen krankheitsfreien 5-Jahres-Überlebensrate von lediglich 40% - 50% führt^{13 14}. Die Bezeichnung alveoläres RMS leitet sich von einer histologischen Ähnlichkeit zu Lungenalveolen ab. Die eher rundlichen (also nicht spindeligen) Tumorzellen reihen sich kohäsiv entlang fibrovaskulärer Septen auf, während die gefäßfernen Tumorzellen diskohäsive, lockere Zellnester bilden¹².

Charakteristisch für diese Subgruppe sind reziproke chromosomale Translokationen bei denen es zu einem Fusionsprodukt aus einem Pax-Transkriptionsfaktor und dem *forkhead* (FKHR)-Gen auf Chromosom 13 kommt. Die mit ca. 50% am häufigsten auftretende Translokation setzt sich aus dem FKHR-Gen und dem auf Chromosom 2 lokalisierten Pax3-Gen zusammen (t(2; 13)(q35; q14)). Ein deutlich kleinerer Anteil ARMS weist eine Translokation von FKHR mit Pax7 von Chromosom 1 (t(1; 13)(p36; q14)) auf^{12 14 19 20}. In beiden Fällen wird ein funktionsfähiges Protein erzeugt⁷, das aus der DNA-Bindedomäne des Pax-Gens und der Transaktivierungsdomäne des FKHR-Gens besteht (Abbildung 1.5). Die aus der Fusion hervorgegangenen chimären Transkriptionsfaktoren weisen im Gegensatz zu den natürlich vorkommenden Proteinen eine stärkere DNA-Bindung und erhöhte

Transaktivierungsaktivität auf^{9 21} und führen zur Expression von Genen, die Proliferation und Invasion der Tumorzellen fördern²².

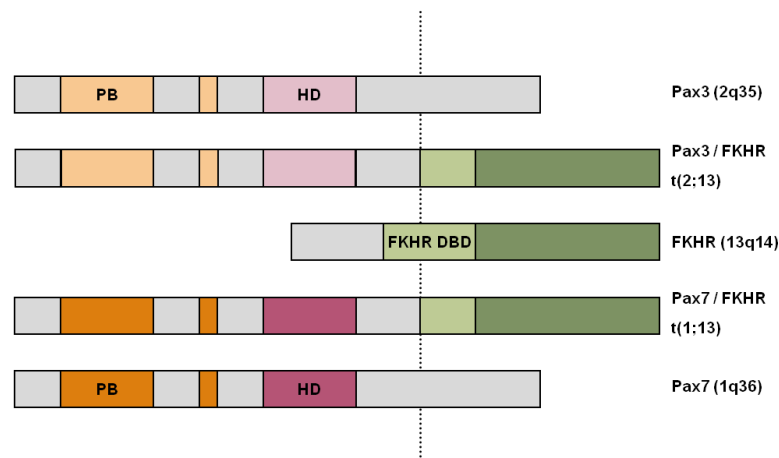


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Wildtyp-Proteine und Pax-FKHR Fusionsprodukte bei alveolären Rhabdomyosarkomen²³; PD - *paired box* Homeodomäne, HD - *paired typ* Homeodomäne, FKHR DBD - *forkhead* DNA-Bindedomäne.

Rund 30% aller histologisch eindeutig als ARMS identifizierter Tumore weisen keine der beschriebenen Translokationen auf (Abbildung 1.6). Neben seltenen Translokationen unter Einbeziehung von Pax3 (wie Pax3-AFX oder Pax3-NCOA²⁴) sind solche translokationsnegativen ARMS durch komplexe Karyotypen mit „*allelischer Inbalance*“ und diversen LOHs charakterisiert und ähneln in ihrem Genexpressionsprofil eher ERMS¹⁴.

Molekulare Subtypen von ARMS

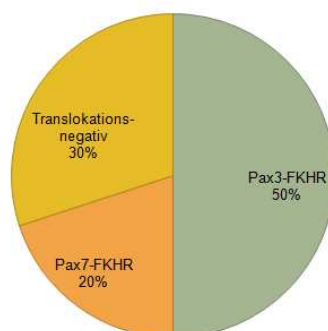


Abbildung 1.6: Schematische Verteilung der molekularen Subgruppen von ARMS^{12 14}.

Die molekularbiologischen Unterschiede innerhalb der ARMS beeinflussen stark deren Prognose²⁵. Die krankheitsfreie 5-Jahres-Überlebensrate von Pax3-FKHR translozierten ARMS liegt aufgrund ihrer Neigung zu früher Metastasierung bei nur 35%, während

Pax7-FKHR translozierte ARMS eine 5-Jahres-Überlebensrate von bis zu 92% aufweisen¹⁴. Die Überlebensrate der heterogenen Klasse von translokations-negativen ARMS liegt zwischen derjenigen der Pax3-FKHR- und Pax7-FKHR-positiven ARMS²⁵.

1.2 RMS und muskuläre Differenzierung

RMS exprimieren eine Vielzahl muskulärer Differenzierungsgene, wie MyoD1, Myogenin, Desmin und Aktin^{11 12}, was eine Abgrenzung gegenüber anderen rund- und kleinzelligen Tumoren, wie Ewing-Sarkomen oder Wilms-Tumoren, ermöglicht^{26 27}. Diese Gene spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung unreifer, proliferierender Myoblasten hin zu hoch differenzierten Muskelzellen^{11 28 29}.

1.2.1 Differenzierung normaler Skelettmuskulatur

Während der Embryogenese erfolgt die Myogenese der quergestreiften Muskulatur in den Somiten, segmentierten Strukturen, die beidseitig entlang des Neuralrohrs aus Mesenchym entstehen²⁸. Abschnürung und Differenzierung der Somiten erfolgen entlang der Längsachse des Embryos von anterior nach posterior. Im Verlauf der Entwicklung zeigen die Somiten eine Aufteilung in verschiedene Kompartimente, aus denen jeweils unterschiedliche Gewebe entstehen. Dazu gehört unter anderem das dorsolateral aus einem Somiten entstehende Dermamyotom, aus dem in späteren Entwicklungsstadien jeweils ein Dermatome und ein Myotome hervorgehen (Abbildung 1.7)²⁸. Die beginnende muskuläre Differenzierung ist in diesem Embryonalstadium durch die Expression zweier evolutionär stark konservierter Homeobox-Gene, Pax3 und Pax7³⁰, gekennzeichnet.

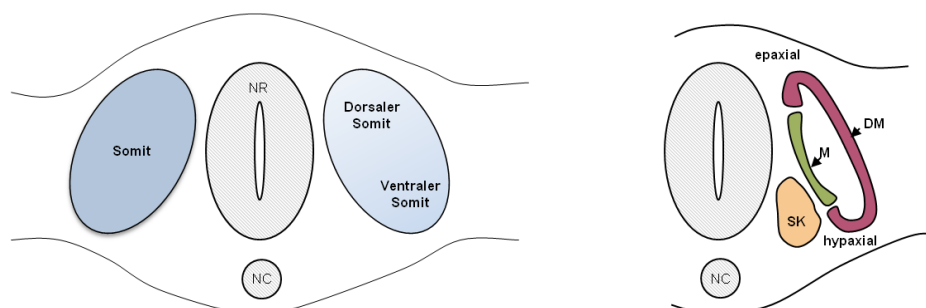


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Somitenanlagen im Embryo nach Mok *et al.*²⁸. Aus den dorsalen Abschnitten der Somiten entsteht das Dermamyotom, der ventrale Abschnitt bildet das Sklerotom; NC - Notochord, NR - Neuralrohr, DM - Dermamyotom, M - Myotom, SK - Sklerotom. Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Society for Reproduction and Fertility; Reproduction, Mok *et al.*, 2011.

„Knock out“-Experimente in der Maus konnten zeigen, dass die Expression von Pax3 und Pax7 für die muskuläre Entwicklung essentiell ist. Pax7-defiziente Mäuse bilden keine Satelliten-Zellen, die zur Aufrechterhaltung postnataler Muskulatur nötig sind^{21 30 31}, während Pax3-defiziente Mäuse im Verlauf der Embryogenese keinerlei hypaxiale und epaxiale Muskulatur erzeugen und bereits *in utero* sterben^{21 30 32}.

Die Expression der Pax-Gene gewährleistet zunächst die Proliferation und das Überleben der wandernden Myoblasten³³ sowie deren anschließende Differenzierung^{34 35}. Zu diesem Zeitpunkt wird als erster muskulärer Differenzierungsmarker Myf5 exprimiert, welcher seinerseits die Expression anderer myogener Faktoren induziert. Zu diesen zählen die auch bei RMS nachweisbaren, muskulären Differenzierungsgene MyoD, Myogenin und Mrf4, die zur Familie der myogenen regulatorischen Faktoren (*myogenic regulatory factors*, MRF) gehören. Im Verlauf der muskulären Entwicklung wird mit fortschreitender Expression der Gene aus der MRF-Familie die Expression der Pax-Gene reprimiert und die Zelle wechselt von einem proliferierenden Status (Myoblast) in eine postmitotisch differenzierte Muskelzelle (Myozyt)²⁸.

1.2.2 Expression skelettmuskelspezifischer Gene in RMS

Beide Rhabdomyosarkom Subtypen, ERMS und ARMS, weisen entweder eine Expression des Pax3- oder Pax7-Gens auf⁷. Bei ERMS und den translokations-negativen ARMS handelt es sich dabei vorwiegend um Pax7, während translokations-positive ARMS, je nach Translokationsstatus, entweder Pax3 oder Pax7 exprimieren. Die Induktion muskelspezifischer Gene der MRF-Familie durch die beiden Homeobox-Gene³⁴⁻³⁶ bedingt somit die muskuläre Prägung von RMS.

Die Expression von Pax3 und Pax7 hält den proliferativen Status der Zellen aufrecht, während zeitgleich die Expression der myogenen Faktoren induziert wird. Im Gegensatz zur muskulären Entwicklung wird bei RMS die Pax-Expression durch die Induktion der MRF-Familie allerdings nicht reprimiert^{37 38}. Es wird daher vermutet, dass die Pax-Gene für die Aufrechterhaltung der Proliferation und des geringen Differenzierungsgrades bei RMS verantwortlich sind³⁷⁻³⁹. Gleichzeitig wird die verstärkte Pax-Expression bei RMS im Zusammenhang mit der Entwicklung metastasierender Tumore gesehen⁴⁰, da die beiden Homeobox-Gene insbesondere bei wandernden Myoblasten in der Embryogenese nachgewiesen werden können.

Neben der unterschiedlichen Ausprägung der Pax-Expression weisen die beiden RMS Subtypen Unterschiede in der Expression von Myogenin auf. Dieser MRF-Faktor tritt in der muskulären Differenzierung später in Erscheinung als MyoD und Myf5 und kann bei ARMS in fast allen Tumorzellkernen detektiert werden, während ERMS meist nur eine partielle und schwächere Expression aufweisen²⁶.

1.3 Immunologische Aspekte der Tumorentstehung und Tumorabwehr bei RMS und anderen Tumoren

Bevor auf die wenigen zu Beginn dieser Arbeit bekannten immunologischen Eigenschaften von RMS eingegangen wird, soll zuerst die besser untersuchte Rolle des Immunsystems bei anderen Tumoren dargestellt werden.

1.3.1 Die Rolle des Immunsystems bei der Entstehung und Progression nicht-rhabdomyomatöser Tumore

Für malignes Wachstum von Tumoren müssen mehrere Voraussetzungen erfüllt sein. Dazu zählen die autokrine, parakrine oder hormonelle Versorgung der sich entwickelnden Tumorzellen mit Wachstumssignalen, eine Unempfindlichkeit gegenüber inhibierenden Signalen, ein hohes Maß an Replikationsfähigkeit, die Ausschaltung von Apoptose-Mechanismen sowie die Fähigkeit zur Angiogenese mit anschließendem, invasivem Wachstum^{41 42}.

Darüber hinaus nimmt das Immunsystem eine Schlüsselrolle bei der Entstehung vieler Tumore ein, da entartete Zellen vom körpereigenen Immunsystem normalerweise erkannt und zerstört werden. Die Etablierung eines Tumors ist somit auch abhängig von seiner Fähigkeit der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen und/oder eventuelle anti-tumoröse Immunreaktionen zu supprimieren⁴². Solche „*escape*“-Mechanismen reichen von der Expression immunsupprimierender Moleküle auf der Tumorzelloberfläche, über diverse intrazelluläre Resistenzmechanismen gegenüber zytotoxischen T-Zellen (z.B. Apoptoseresistenz⁴³), bis hin zur Rekrutierung immunregulatorischer Zellen, die im Tumorstroma zytotoxische Effektorzellen neutralisieren⁴⁴.

In der Frühphase der Entstehung mancher Tumoren kann die Etablierung eines eigentlich gegen den Tumor gerichteten immunologischen Mikromilieus paradoxerweise zur Förderung des Tumorwachstums führen, indem Zellen des Immunsystems - auch unter Beteiligung der entstehenden Tumorzellen selbst⁴⁵ - zur Produktion von Wachstumsfaktoren und

Umstrukturierung der extrazellulären Matrix angeregt werden⁴⁵⁻⁴⁷. Dadurch wird die Invasion der Tumorzellen und die Versorgung des Tumors mit Blutgefäßen (Angiogenese) gefördert⁴⁸. Mit zunehmender Tumorgroße und –heterogenität sowie der Entstehung immunogener Subklone, werden die Tumorzellen verstärkt vom Immunsystem attackiert⁴⁸. Der erhöhte Selektionsdruck, in Kombination mit einer hohen Proliferationsrate und einer damit verbundenen genetischen Instabilität der Tumorzellen, führt schließlich zur Selektion von Zellklonen, die nur noch eingeschränkt immunogen sind und vom Immunsystem nicht mehr erkannt werden^{42 49}. Die Entwicklung zunächst immunogener und heterogener Tumorzellpopulationen hin zu einer Population, die für das Immunsystem „unsichtbar“ ist, wird als „*Cancer Immunoediting*“ bezeichnet^{49 50}.

1.3.1.1 *Cancer Immunoediting*

Die erste Phase des „*Immunoediting*“ besteht in der Eliminierung des Tumors durch das angeborene und adaptive Immunsystem. Dabei werden zunächst Zellen des angeborenen Immunsystem wie natürliche Killerzellen (NK), NKT-Zellen, Makrophagen und $\gamma\delta$ -T-Zellen rekrutiert, die durch die Produktion von Zytokinen, speziell IFN γ , antiproliferative, proapoptotische und angiostatische Effekte im Tumor hervorrufen können^{51 52}. Gleichzeitig kommt es durch die Aktivierung dendritischer Zellen und die Präsentation von Tumorantigenen in den Lymphknoten zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems (Abbildung 1.8).

Dazu werden Tumorantigene über MHC-I- oder MHC-II-Moleküle zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺) bzw. T-Helfer Zellen (CD4⁺) präsentiert. Bei MHC-I-gebundenen Antigenen handelt es sich in der Regel um die Präsentation zelleigener Proteine, während es sich bei MHC-II-gebundenen Antigenen um exogene Proteine handelt, die über Phago-Lysosomen aufgenommen, intrazellulär abgebaut und in Form von Peptidfragmenten an MHC-II-Moleküle gebunden präsentiert werden.

Für eine tumorspezifische Immunreaktion ist die Interaktion von zytotoxischen T-Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocytes*, CTL) mit den Tumorzellen von besonderer Bedeutung und beruht auf der Erkennung eines MHC-I-abhängig präsentierten Tumorantigens und der Bindung an einen spezifischen T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*, TCR).

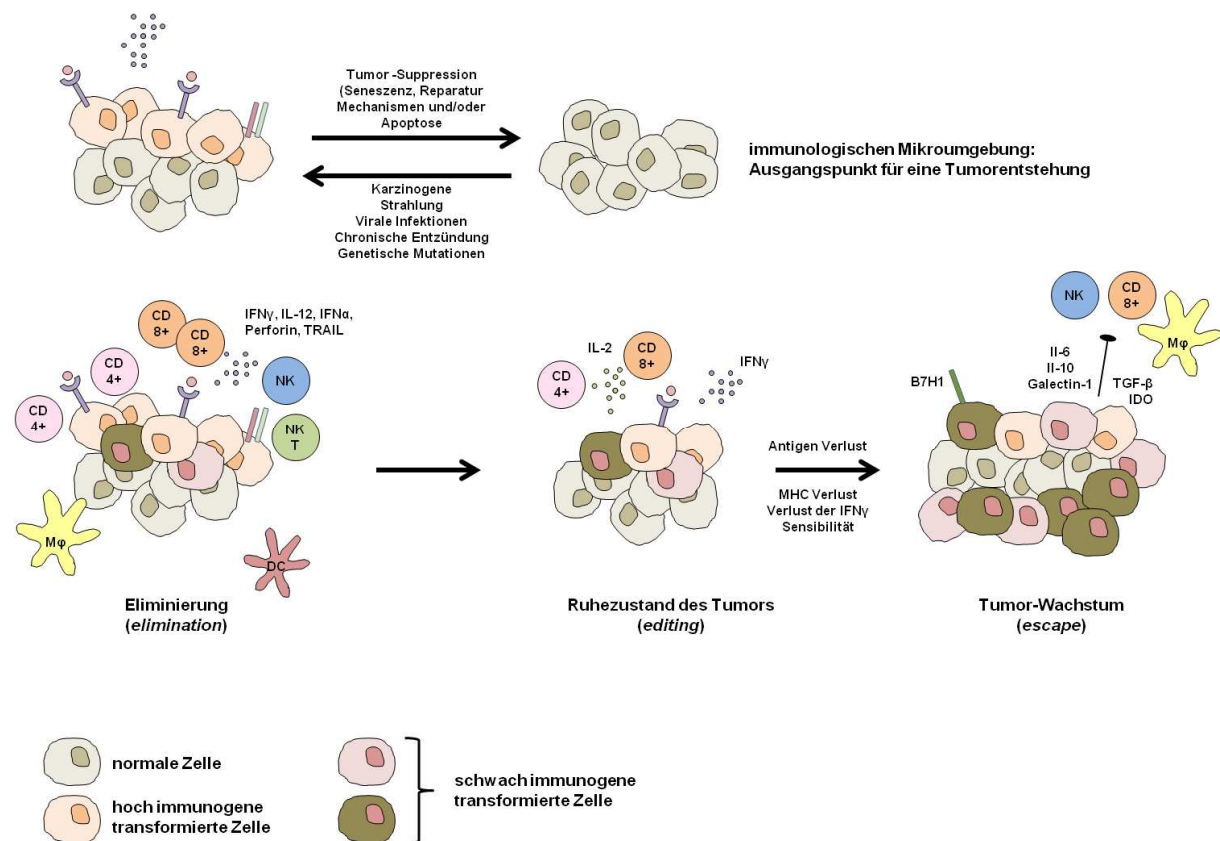


Abbildung 1.8: Darstellung des Tumor *Immunoediting* Konzepts bestehend aus den drei Phasen: Eliminierung, Equilibrierung und *Escape* (nach Dunn *et al.*⁴⁹, Schreiber *et al.*⁵³, Vesely *et al.*⁵⁴).

Die Präsentation der Antigene ist dabei abhängig von einer intrazellulären Maschinerie, die zelleigene Proteine proteasomal abbaut und die resultierenden Peptidfragmente über einen Peptid-Transporter in das Endoplasmatische Retikulum schleust, wo die Fragmente an MHC-Klasse-I-Komplexe gekoppelt und anschließend an der Zelloberfläche präsentiert werden (Abbildung 1.9). Mit der Erkennung eines präsentierten Antigens durch einen antigenspezifischen TCR wird die betroffene Zelle als körperfremde Zelle eingeordnet und eliminiert⁵⁵⁻⁵⁷.

Die MHC-abhängige Erkennung tumorspezifischer Antigene erfolgt durch tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL); einer heterogenen Gruppe zytotoxischer T-Zellen, die einen Tumor aufgrund ihrer Spezifität für tumorassoziierte Antigene (TAA) infiltrieren und lysieren^{58 59}. Die Zelllyse wird über die Sekretion zytolytischer Granula (Perforin/Granzym) oder die Aktivierung von Todesrezeptoren, wie FAS oder TRAIL-R, vermittelt^{60 61}. Für die vorliegende Arbeit ist wichtig, dass die hohe IFN γ -Produktion durch Zellen des Immunsystems *normalerweise* zu einer verstärkten Expression der Komponenten des MHC-Präsentationsweges in Tumorzellen führt und so die Zelllyse durch tumorspezifische

T-Zellen unterstützt^{58 59}. Dieser physiologische Effekt kann jedoch im Sinne eines „escape“-Mechanismus gestört sein (s. unten).

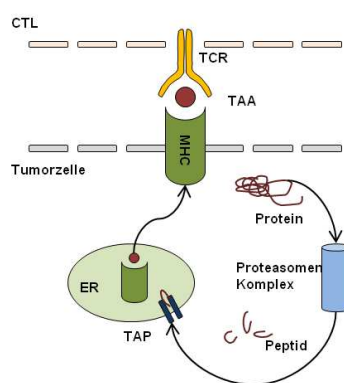


Abbildung 1.9: Präsentation von Tumorantigenen (TAA) über den MHC-I-Komplex. Dazu werden proteasomal abgebaute Proteine als Peptide über den TAP-Komplex in das ER geschleust und über Tapasin an ein MHC-I-Molekül gekoppelt. MHC-Peptid-Komplexe werden über den Golgi Apparat an die Zelloberfläche transportiert und den CTL präsentiert; CTL - zytotoxische T-Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocytes*), TCR - T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*), MHC - Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*), ER - Endoplasmatisches Retikulum, TAA - Tumorantigen, TAP - *transporter associated with antigen processing*.

Falls nicht alle Tumorzellen durch das Immunsystem vernichtet werden, kann es zur Entwicklung eines Gleichgewichtes zwischen Tumorwachstum und Eliminierung der Tumorzellen durch das Immunsystem kommen^{49 53 62}. Dieser „Ruhezustand“ des Tumors kann im besten Fall über einen langen Zeitraum aufrecht erhalten werden, oder in die Entwicklung von Tumorzellen münden, die infolge des anhaltenden immunogenen Drucks Mechanismen entwickeln, sich dem Immunsystem zu entziehen (Abbildung 1.8)⁶³.

Dazu zählt u.a. die eingeschränkte Präsentation von Tumorantigenen aufgrund eines MHC-I-Verlustes oder anderer Faktoren, die für die Antigen-Präsentation nötig sind^{42 43 64}. Das wiederum führt zu einer eingeschränkten Erkennung der Tumorzellen durch zytotoxische T-Lymphozyten.

Weitere Tumor „escape“-Mechanismen sind die Resistenz gegenüber $\text{IFN}\gamma$ ⁴⁹, die Expression immunsuppressiver Zytokine (z.B. $\text{TGF}\beta$ oder Galectin)⁵⁴ und immunsupprimierender Oberflächenmoleküle (z.B. B7H1^{65 66}) sowie die Rekrutierung regulatorischer lymphozytärer (z.B. T_{reg} -Zellen)^{67 68} oder myeloischer Zellen (*myeloid derived suppressor cells*, MDSC)⁶⁹. Regulatorische Zellen wirken sich durch die Produktion von Zytokinen (IL-10 und $\text{TGF}\beta$) und negativen Kostimulatoren (wie CTLA-4 und B7H1) immunsuppressiv auf die Aktivität zytotoxischer T-Zellen aus^{53 70}.

1.3.1.2 Die Rolle kostimulatorischer Moleküle für die Antigenerkennung

Für die effektive T-Zellaktivierung ist neben einem MHC-abhängigen, Antigen-spezifischen Signal, ein zweites Antigen-unabhängiges Signal nötig, welches durch die Interaktion zwischen Oberflächenmolekülen auf Tumorzellen oder dendritischen Zellen (z.B. B7.1

(CD80), B7.2 (CD86) oder CD40), bzw. deren Liganden auf T-Zellen (z.B. CD28 bzw. CTLA-4), vermittelt wird^{71 72}. Tumorzellen selbst weisen oftmals nur eine eingeschränkte oder fehlende Expression der benötigten Kostimulatoren auf. Dadurch bleibt das für die Aktivität der T-Zellen entscheidende Wachstumssignal aus, was eine Anergie (fehlende Immunantwort) der entsprechenden Immunzellen zur Folge haben kann und somit wiederum das Tumorwachstum begünstigt⁷³. Als Alternative greift das Immunsystem bei der Präsentation von Antigenen auf professionelle Antigen-präsentierende Zellen (*antigen presenting cell*, APC), wie dendritische Zellen (*dendritic cell*, DC) und Monozyten zurück, die neben der MHC-I-abhängigen Präsentation des Antigens, die benötigten Kostimulatoren zur Verfügung stellen. Da die Antigen-Präsentation von einer endogenen Synthese-Maschinerie abhängig ist, müssen APC, ähnlich wie im Falle von MHC-II, die Antigene zunächst aufnehmen und dann über den zelleigenen MHC-I-Signalweg auf der Zelloberfläche anbieten. Dieses Vorgehen wird als Kreuzpräsentation (*cross presentation*, *cross priming*) bezeichnet und beruht auf der Fähigkeit von APC apoptotische oder nekrotische Tumorzellen durch Phagozytose aufzunehmen. Die Antigenaufnahme führt zur Reifung und Migration der APC, vorrangig dendritischer Zellen, in Richtung der lymphatischen Organe und der MHC-abhängigen Präsentation gegenüber zytotoxischen T-Zellen (Abbildung 1.10)^{57 74 75}.

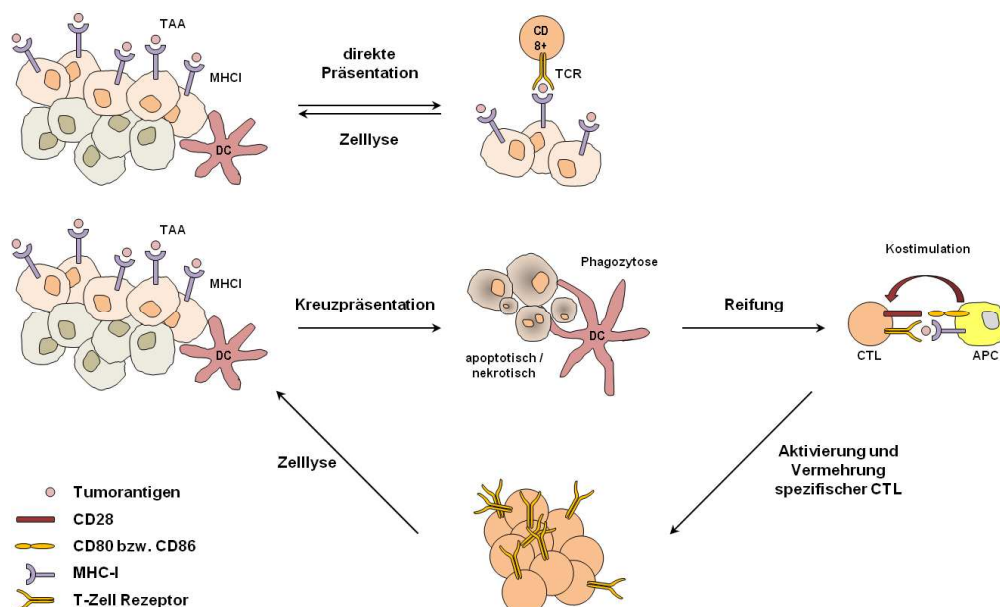


Abbildung 1.10: Präsentation von Tumorantigenen über den direkten Weg oder über die Kreuzpräsentation (*cross presentation*) durch Antigen-präsentierende Zellen (APC); DC – dendritische Zellen, APC – professionelle Antigen-präsentierende Zelle, CTL – zytotoxische T-Lymphozyten, TAA – Tumorantigen, TCR – T-Zell-Rezeptor.

T-Zellen, die die präsentierten Antigene erkennen, werden über die Bindung der Kostimulatoren zur Proliferation angeregt und aktiviert. Treffen sie nach dem Verlassen der lymphatischen Organe auf ihr spezifisches Antigen, wird die Zelllyse typischerweise über den Perforin/Granzym-Weg oder über Todesrezeptoren, eingeleitet^{57 76}.

1.3.1.3 Die Rolle der Apoptose bei der Immunabwehr von Tumorzellen

Die Zelllyse von Tumorzellen erfolgt vorwiegend über eine T-Zell vermittelte Apoptose. Da ihre Induktion den wichtigsten Mechanismus für die Vernichtung von Tumorzellen durch das Immunsystem darstellt und die Apoptosehemmung von zentraler Bedeutung für einen effektiven „immune escape“ der Tumorzellen ist, wird im Folgenden auf die verbreitetsten Mechanismen eingegangen.

Die Apoptose ist ein physiologisches „Todesprogramm“, das multizellulären Organismen die Entfernung alter, überflüssiger oder geschädigter (z.B. genetisch alterierter Tumor-) Zellen erlaubt⁷⁷, ohne starke inflammatorische Reaktionen auszulösen⁷¹. Induktion und Fortschreiten der Apoptose werden maßgeblich von Caspasen bestimmt. Das sind Cysteinproteasen, die Peptidbindungen C-terminal der Aminosäure Aspartat spalten⁷⁸. In der Zelle liegen Caspasen in ihrer inaktiven Form als sog. Procaspasen vor, die als Reaktion auf proapoptotische Stimuli gespalten werden. Die aktive Caspase setzt sich dabei als Heterotetramer aus den Spaltprodukten zusammen⁷⁹. Unterteilt werden die Caspasen in Initiator-Caspasen, zu denen die Caspasen 8, 9 und 10 gehören und Effektor-Caspasen, zu denen die Caspasen 3, 6 und 7 zählen⁸⁰. Die durch Caspasen eingeleitete Apoptose kann sowohl intrinsisch über die Mitochondrien vermittelt werden als auch extrinsisch über sog. Todesrezeptoren verlaufen.

Der intrinsische Apoptoseweg wird durch die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien eingeleitet⁸¹. Cytochrom c induziert im Cytosol zusammen mit dem Adaptorprotein APAF-1 und der Caspase 9 die Bildung eines sog. Apoptosoms⁸², welches als katalytischer Komplex die Aktivierung der Effektor-Caspasen 3 und 7 vermittelt und somit zur Apoptose führt⁸³. Reguliert wird die mitochondriale Apoptose-Induktion über Mitglieder der Bcl-2 (*B cell lymphoma 2*)-Familie. Abhängig von der Anzahl der Bcl-2 Homologie-Domänen (BH) wird die Familie in drei Unterfamilien unterteilt. Die einzige antiapoptotische Unterfamilie besteht aus Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 sowie Bcl-W, die jeweils vier BH-Domänen aufweisen. Die anderen beiden Subfamilien übernehmen proapoptotische Funktionen, wobei einer der Proteinfamilien lediglich die BH4-Domäne fehlt (Bax, Bak und Bok), während die andere Unterfamilie als einzige BH-Domäne eine

BH3-Domäne aufweist (*BH3 only*). Die Aktivierung der „*BH3 only*“-Proteine, zu denen Bid, Bim, Noxa und Puma gehören, führt zur Oligomerisierung von Bak und Bax und einer Kanalbildung in der äußeren Mitochondrienmembran⁸⁴. Die Stimulation der „*BH3 only*“-Proteine erfolgt durch zytotoxische Signale und erlaubt aktivierten BH3-Domänen mit einer hydrophoben Grube an der Oberfläche von antiapoptotischen Molekülen zu interagieren und so Überlebenssignale zu inhibieren. Zu den Signalen, welche die intrinsische Apoptose auslösen können, gehören neben physiologischen Stimuli, wie dem Verlust der Zytokin-Versorgung bzw. der Zell-Matrix-Interaktion, auch Signale die durch Onkogene, DNA-Schädigung, Chemotherapeutika oder γ -Strahlung ausgelöst werden^{85 86}. Die dadurch induzierte Kanalbildung durch Bak und Bax bewirkt über die Freisetzung von Cytochrom c die Einleitung der Apoptose und kann wiederum durch die verstärkte Expression von antiapoptotischen Proteinen, wie Bcl-2 und Bcl-XL, inhibiert werden (Abbildung 1.11)^{80 87 88}.

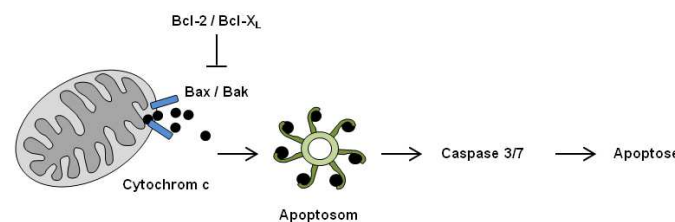


Abbildung 1.11: Intrinsischer Apoptoseweg - vermittelt über die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und Freisetzung von Cytochrom c, was zur Bildung eines Apoptosom und der Aktivierung der Caspase-Kaskade führt.

Der extrinsische Apoptoseweg kann durch zytotoxische Effektorzellen aktiviert werden, indem deren Liganden sog. Todesrezeptoren auf (Tumor-) Zielzellen stimulieren. Todesrezeptoren gehören zur TNF (*tumor necrosis factor*)-Superfamilie und sind durch eine ca. 80 Aminosäuren umspannende intrazelluläre Todesdomäne charakterisiert, die für die Einleitung der Apoptose in den Zielzellen essentiell ist⁸⁹.

Typischerweise bilden Todesrezeptoren an der Zelloberfläche Oligomere (aus Rezeptor-Trimeren), die durch eine cysteinreiche Region, genannt PLAD (*preligand assembly domain*), im extrazellulären Rezepterteil stabilisiert werden⁹⁰. Durch die Bindung eines Liganden kommt es bei den Rezeptordomänen zu Konformationsänderungen, die über die Todesdomänen zur Rekrutierung verschiedener Adapterproteine führen. Je nach Rezeptor handelt es sich um FADD (*FAS associated protein with death domain*) oder TRADD (*TNF receptor associated protein with death domain*), sowie die beiden Initiator-Caspasen 8 und

10, und den Caspase-Regulator cFLIP_L (*long form of the cellular FLICE/caspase 8 like inhibitory protein*)^{91 92}.

Die Wechselwirkung der verschiedenen, am Signalmechanismus beteiligten Komponenten erfolgt über „Todes-Effektordomänen“ und führt zur Bildung eines Komplexes, DISC (*death inducing signaling complex*), der über einen bisher noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus die Aktivierung der Caspase-Kaskade⁹¹ und die darauf folgende Apoptose einleitet. Die wichtigsten Todesrezeptoren sind FAS (CD95), TNF- und TRAIL-Rezeptoren (*TNF-related apoptosis inducing ligand receptor*)⁹¹.

1) FAS/FAS-L: Der Ligand des Todesrezeptors FAS kommt sowohl in löslicher als auch membrangebundener Form vor. Aktivierte T-Zellen exprimieren überwiegend letztere und können so bei FAS exprimierenden Tumorzellen die Apoptose induzieren^{91 93}. Die Interaktion von Ligand und Rezeptor führt zu einer Aggregation der Rezeptoren und der gleichzeitigen Bindung von FADD. Diese Strukturen sind als sog. SPOTS (*signaling protein oligomerization structure*) mikroskopisch erkennbar⁹⁴. Der weitere Verlauf des Signalweges ist abhängig von der FAS-Rezeptordichte auf der Zelloberfläche und verläuft entweder unter Beteiligung von Endosomen (Typ I, bei hoher Rezeptordichte) oder Mitochondrien (Typ II, bei niedriger Rezeptordichte)^{92 95}.

Der Signaltransduktionsweg bei Zellen des Typs I wird über die Internalisierung der Rezeptoren und die Verschmelzung mit Endosomen vermittelt, in denen die Bildung des DISC-Komplexes erfolgt⁹⁶. Im Falle des FAS-Signaltransduktionsweges besteht dieser aus FADD, den Initiator-Caspasen 8 und 10, sowie cFLIP_L⁹¹. Konformationsänderungen der Enzyme innerhalb des DISC-Komplexes führen vermutlich zu einer auto-protolytischen Spaltung der Caspase 8 und der Freisetzung des aktiven Enzyms^{97 98}. Die Freisetzung leitet die Aktivierung weiterer Effektor-Caspasen, wie Caspase 3 und 7, und damit die Apoptose ein (Abbildung 1.12 (A))⁸⁸.

Im Gegensatz dazu ist bei Zellen des Typ II die Internalisierung des FAS-Rezeptor-Komplexes nicht notwendig⁹¹. Ähnlich wie im Falle der Typ I-Zellen kommt es zu einem Zusammenschluss mehrerer Rezeptor-Trimere und intrazellulär zu einer Assoziierung mit FADD, cFLIP und Caspase 8. Dabei scheint die Erzeugung des DISC-Komplex in Typ II-Zellen langsamer und in einem geringeren Maße zu erfolgen als dies für Typ I-Zellen zu beobachten ist⁹⁹. Anders als in Typ I-Zellen kommt es hier zu einer Caspase 8 vermittelten Spaltung des cytosolischen Bid in tBid (*truncated Bid*). tBid wiederum führt zur Oligomerisierung von Bax/Bad, wodurch die Apoptose über die

Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien initiiert wird (Abbildung 1.11 und 1.12 (B)). Die Einleitung der mitochondrialen Apoptose bei Zellen des Typs II kann durch verstärkte Expression von Bcl-2 oder Bcl-X_L inhibiert werden, während die beiden Proteine auf die Apoptose-Induktion bei Zellen des Typs I keinen Einfluss haben^{88 91 99}.

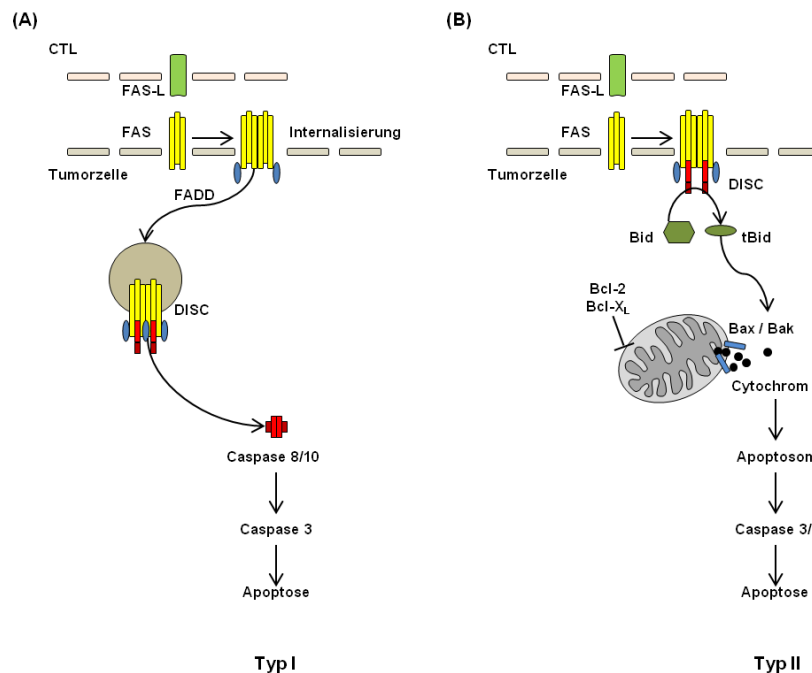


Abbildung 1.12: FAS vermittelter Signaltransduktionsweg zur Induktion der Apoptose in Typ I (A) und Typ II (B) Zellen nach Guicciardi *et al.*⁹¹ und Strasser *et al.*¹⁰⁰; DISC – death inducing signaling complex, FADD – FAS associated protein with death domain.

Die Stimulierung von FAS induziert nicht zwangsläufig die Apoptose, sondern kann auch eine Aktivierung des NF- κ B Weges und der drei großen MAPK-Signaltransduktionswege, ERK1/2, p38 und JNK1/2, bewirken^{92 101 102}. Alle drei Signalwege führen zu einer Induktion von Genen, die Einfluss auf Invasion, Metastasierung und Apoptose-Resistenz haben und somit die Eliminierung der Tumorzellen verhindern¹⁰³. Der Schwellenwert für die Aktivierung des proliferativen/antiapoptotischen Signalweges scheint dabei wesentlich niedriger zu liegen als für den proapoptotischen Signalweg, der zwei funktionell aktive FAS-Gene erfordert¹⁰⁴.

2) TRAIL-Rezeptoren/TRAIL: Bei den zweiten bekannten Todesrezeptoren handelt es sich um TRAIL-Rezeptoren, die durch die Bindung von TRAIL (*TNF related apoptosis inducing ligand*) aktiviert werden. Bisher sind vier verschiedene TRAIL-Rezeptoren (TRAIL-R) bekannt, von denen lediglich TRAIL-R1 und R2 Apoptose induzieren. Bei TRAIL-R3 und R4

handelt es sich um verkürzte Proteine, bei denen die Todesdomäne vollständig (TRAIL-R3) oder teilweise (TRAIL-R4) fehlt. Durch eine Überexpression von TRAIL-R3 und TRAIL-R4 kann es zu einer Inhibierung des apoptotischen Signaltransduktionsweges kommen, indem TRAIL vollständig von den beiden sog. „Decoy“ (Köder)-Rezeptoren abgefangen wird^{105 106}. Die Apoptose-Induktion verläuft ähnlich wie bei FAS. Nach einer TRAIL-R1 und/oder R2 Rezeptor-Oligomerisierung kommt es zur Bildung eines intrazellulären DISC-Komplex aus FADD, Caspase 8 und Caspase 10¹⁰⁷. Im Gegensatz zu einer FAS-L induzierten Apoptose ist die Endozytose der Rezeptoren, obwohl vorhanden, für die Apoptose-Induktion allerdings nicht essentiell¹⁰⁸. Vielmehr wird durch die Rezeptoraggregation an der Zelloberfläche, anders als bei FAS, genügend Caspase 8 gespalten, um die Effektor-Caspasen 3 und 7 unter Umgehung der Mitochondrien direkt zu aktivieren. Umgekehrt geht die quantitativ im Hintergrund stehende Internalisierung von TRAIL-Rezeptorkomplexen mit der Aktivierung des mitochondrialen Signalweges einher⁹¹, sodass die Induktion der beiden Apoptosewege genau gegensätzlich zur FAS-assoziierten Apoptose abläuft (Abbildung 1.13 (A) und (B)).

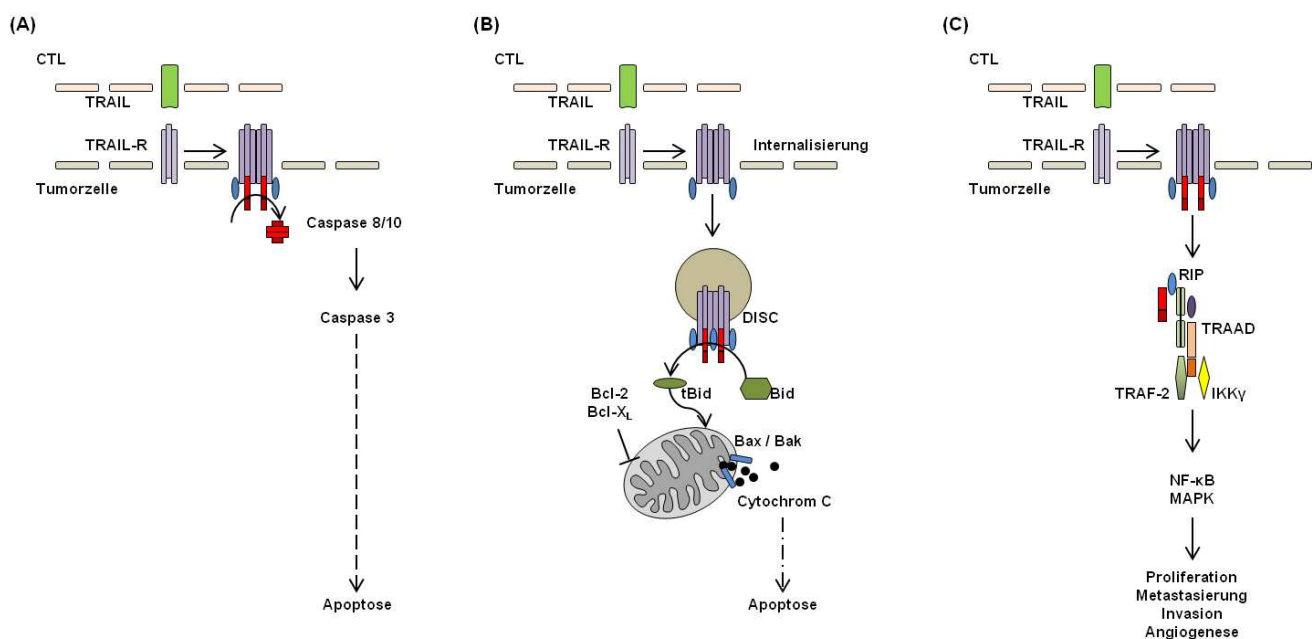


Abbildung 1.13: TRAIL vermittelter Signaltransduktionsweg zur Induktion der Apoptose in Typ I (A) und Typ II-Zellen (B), sowie ein TRAIL-vermittelter Signaltansduktionsweg der über die Aktivierung des NF-κB Weges zur Zellproliferation und Metastasierung führt (C) (nach Guicciardi *et al.*⁹¹ und Strasser *et al.*¹⁰⁰); TRAIL - *TNF related apoptosis inducing ligand*, DISC – *death inducing signaling complex*, FADD – *FAS associated protein with death domain*, IKKγ – *inhibitor of κB kinase gamma*, MAPK – *mitogen activated protein kinase*, RIP – *receptor interacting protein*, TRAF-2 – *TNF associated factor 2*.

Wie im Falle von FAS sind TRAIL-R offensichtlich nicht nur für die Vermittlung von Todessignalen zuständig, sondern können ebenso antiapoptotische und proliferative Signale vermitteln. Bei Apoptose-resistenten Zelllinien dissoziieren DISC-Komplex und Rezeptor voneinander und es kommt zur Bildung eines zweiten Komplexes unter Beteiligung von RIP1, TRAF2, IKK γ , TRADD, FADD und Caspase 8^{109 110}. Die Bildung dieses sekundären Komplexes führt zur Aktivierung von NF- κ B-, MAP-Kinase- und ERK-Signaltransduktionswegen¹¹⁰ (Abbildung 1.13 (C)). Alle diese Signalwege spielen eine wichtige Rolle in Proliferation, Invasion, Metastasierung und Tumorangiogenese. Auf die Rolle der einzelnen Proteine wird im Folgenden näher eingegangen.

3) TNFR und TNF α : Im Gegensatz zu FAS und TRAIL-R sind die TNFR insgesamt weniger für die Apoptose-Induktion als vielmehr für die Vermittlung von Entzündungsreaktionen relevant⁹¹. TNF α -Signale werden über zwei verschiedene Oberflächenrezeptoren weitergegeben, TNFR1 und TNFR2^{111 112}. TNFR1 ist ubiquitär exprimiert und weist eine intrazelluläre Todesdomäne auf, die dem TNFR2 fehlt. Dadurch ist die Induktion der Apoptose über eine Caspase 8-Spaltung auf die Stimulation des TNFR1 beschränkt, während beide Rezeptoren nach Bindung des Liganden die I κ B-Kinase und MAP-Kinasen (*mitogen activated protein kinase*, wie p38 und JNK) aktivieren können. Aufgrund der Vielzahl TNF α -aktivierbarer Signaltransduktionswege hat TNF α Einfluss auf Zellwachstum und -entwicklung, Immun- und Entzündungsreaktionen, Zelltod und Onkogenese^{111 113}.

Die TNFR können drei Liganden binden: membranständiges TNF α , lösliches TNF α und eine von Lymphozyten produzierte Form, die als LT α bezeichnet wird⁹¹. Bei der aktiven Form von TNF α handelt es sich um ein Homotrimer, das nach der Rezeptorbindung intrazellulär zur Freisetzung des Inhibitor-Proteins SODD (*silencer of death domains*) führt. Dadurch wird verschiedenen Adapterproteinen die Bindung an die intrazelluläre Domäne des TNFR ermöglicht¹¹¹. Ob bei der Bindung des Liganden eher Überlebens- und Proliferationssignale, oder apoptotische Signale an die Zelle weiter gegeben werden, hängt u.a. von der posttranslationalen Modifikation von RIP-1, sowie den Proteinkonzentrationen der antiapoptotischen Proteine cIAP1/2 und cFLIP ab.

Bei der Bindung von RIP, TRAF-2, TRADD und cIAP1/2 an die intrazelluläre Domäne des TNFR kommt es zu Bildung des Rezeptorkomplexes 1 in dessen Verlauf RIP-1 und TRAF-2, möglicherweise von den beiden cIAPs⁹¹, ubiquitiniert werden¹¹⁴. Die Polyubiquitinierung von RIP-1 an Position Lys³⁷⁷ führt zur Stabilisierung des Proteins sowie Bindung und Phosphorylierung von TAK-1, wodurch die I κ B-Kinase (IKK) aktiviert wird^{115 116}. Die

Aktivierung von IKK wiederum führt zur Phosphorylierung und zum proteasomalen Abbau des Inhibitors von NF- κ B (I κ B) und letztlich zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Abbildung 1.14 (A))^{91 111 113 117}.

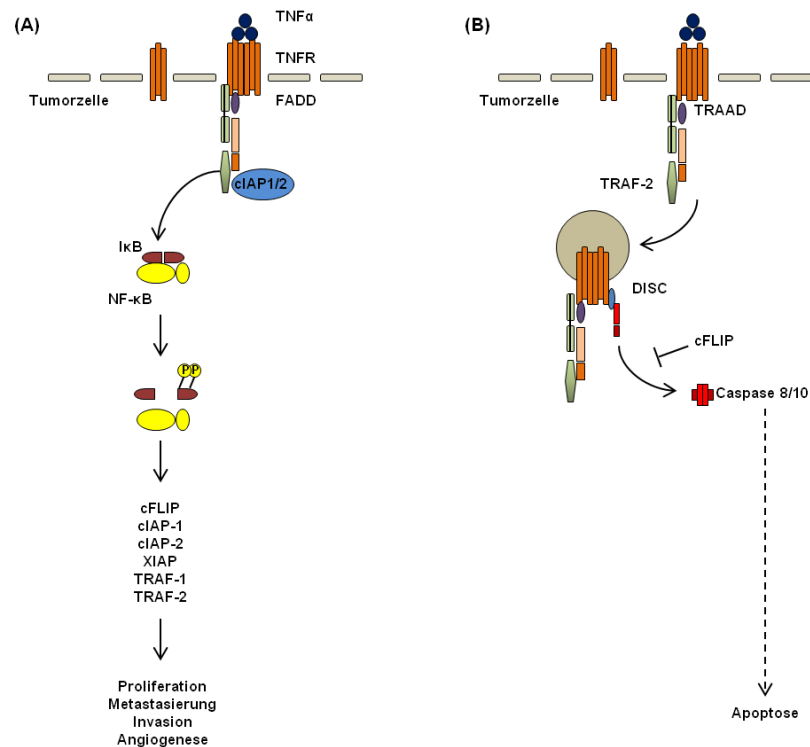


Abbildung 1.14: (A) Aktivierung des NF- κ B-Transkriptionsfaktors über die Bindung von TNF α an den TNFR. (B) Apoptose-Induktion durch die Bindung von TNF α an den TNFR (nach Guicciardi *et al.*⁹¹); cIAP – *inhibitor of apoptosis*; cFLIP – *long form of the cellular FLICE/caspase 8 like inhibitory protein*; DISC – *death inducing signaling complex*, FADD – *FAS associated protein with death domain*; I κ B – Inhibitor von NF- κ B; NF- κ B – *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*; TNF α – *tumor necrosis factor α* , TNFR – TNF α Rezeptor; TRADD – *TNF receptor associated protein with death domain*; TRAF – *TNF receptor associated factor*.

Bei niedrigen Konzentrationen von cIAP1/2 oder einer verminderten Neubildung von cFLIP werden bei der Stimulation des TNFR zusätzlich zu RIP1, TRAF-2 und TRADD, FADD und die Caspasen 8 und 10 rekrutiert. Mit der Internalisierung des Rezeptorkomplexes in Endosomen spricht man von einem Rezeptosom^{91 118}. In diesem Komplex spielt TRAF-2 eine Rolle bei der Bindung und Aktivierung verschiedener Kinasen, die über eine Kinase-Kaskade (MAPKKK, MEKK1, ASK1), die c-Jun-Kinase (JNK) aktivieren und damit den Transkriptionsfaktors c-Jun anschalten¹¹¹. Gleichzeitig führt die Aktivierung der JNK zu einer Phosphorylierung und Aktivierung der E3-Ubiquitin-Ligase Itch, die die Ubiquitinierung von cFLIP vermittelt und so dessen proteasomalen Abbau einleitet. Mit dem Abbau von cFLIP

kommt es zu einer vermehrten Spaltung der Caspase 8 und der Induktion der Caspase-Kaskade, was wiederum zur Apoptose führt (Abbildung 1.14 (B))⁹¹.

4) Perforin/Granzym: Bei der Erkennung eines TAA durch zytotoxische T-Lymphozyten können diese, neben der Bindung an Todesrezeptoren, zytotoxische Granula in den Raum zwischen T-Zelle und Target-Zelle sezernieren¹¹⁹. Die Granula enthalten eine Mischung aus Perforin und Granzymen. Dabei vermittelt Perforin über einen noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus den Übertritt von Granzymen aus dem Extrazellularraum in die Target-Zelle^{61 120}.

Granzyme sind Serin-Proteasen, die die Apoptose über zwei Wege einleiten. Erstens spalten sie die Procaspasen 3 und 7 und stoßen dadurch die Caspase-Kaskade direkt an¹²¹; zweitens können sie die mitochondriale Apoptose initiieren, indem sie Bid spalten, das in seiner aktivierten Form (tBid, *truncated Bid*) zur Oligomerisierung von Bax und Bak beiträgt, sodass ein Kanal in der äußeren Mitochondrienmembran ausgebildet und Cytochrom c freigesetzt wird^{122 123} (Abbildung 1.15).

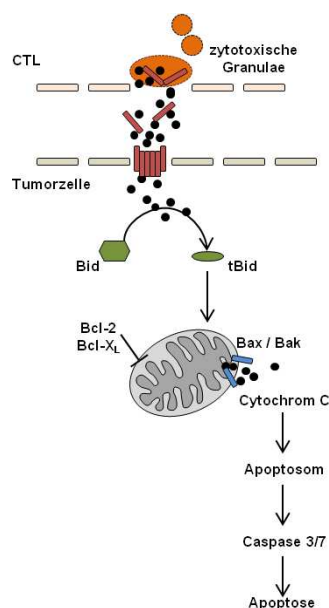


Abbildung 1.15: Granzym/Perforin abhängige Tumorzelllyse durch zytotoxische T-Zellen (nach Cullen *et al.*^{119 120}). Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Macmillan Publishers Ltd.; Cell Death and Differentiation; Cullen *et. al.*; 2007.

Der antiapoptotische Faktor Bcl-2 hemmt die Cytochrom c-Freisetzung indem er einen Komplex mit den beiden proapoptotischen Faktoren Bax und Bak eingeht, wodurch die Bildung des Kanals nicht mehr erfolgen kann. Es hat sich gezeigt, dass eine verstärkte Bcl-2 Expression ausreicht, um die Einleitung der Apoptose zu inhibieren^{119 124 125}, womit der durch die Mitochondrien vermittelte Signalweg als Hauptweg der Granzym-abhängigen Apoptose gilt¹¹⁹.

1.3.1.4 Apoptose-Regulation

Ob die von Todesrezeptoren ausgehenden Signale zu verstärkter Tumorzellproliferation oder zur Apoptose führen (s. oben), hängt von mehreren Regulatorproteinen ab, zu denen u.a. RIP und cFLIP_L sowie die Mitglieder der cIAP-Familie gehören.

1) *RIP1*: RIP1 ist eine Serin/Threonin Kinase, bestehend aus einer N-terminalen Kinase-Domäne, einer intermediären Domäne und einer C-terminalen Todeseffektor-Domäne. In Abhängigkeit von seinen post-transkriptionellen Modifikationen kann RIP1 entweder die Caspase-Kaskade anstoßen oder zum Überleben der Zelle beitragen. So führt die Phosphorylierung von RIP1 zur Aktivierung des antiapoptotischen ERK-Signalweges, während bei einer Polyubiquitinierung an Lys³⁷⁷ der NF-κB-Signalweg angeschaltet wird¹¹⁴. Durch eine Deubiquitinierung von RIP1 kann durch die Rekrutierung von FADD und Caspase 8 die Apoptose einleitet werden¹²⁶.

2) *cFLIP*: Die verschiedenen Varianten von cFLIP regulieren ebenfalls die extrinsische Apoptose. Sie zeigen strukturelle Ähnlichkeit zur Caspase 8, haben aber keinerlei enzymatische Aktivität. Für die kurzen Varianten cFLIP_S und cFLIP_R wird angenommen, dass sie mit der Caspase 8 um die Bindestellen im DISC-Komplex konkurrieren und dessen Funktion kompetitiv hemmen. cFLIP_L unterstützt hingegen die Bildung des DISC-Komplexes durch Bildung von funktionellen Caspase 8/cFLIP-Heterodimeren und wirkt nur bei starker Überexpression als kompetitiver Inhibitor. Ob cFLIP eine pro- oder antiapoptotische Wirkung auf die Zelle hat, ist somit vom Expressionsniveau seiner verschiedenen *Splice*-Varianten abhängig⁹¹.

3) *IAPs*: Zu den Regulatoren, die besonders die Apoptose normaler Zellen verhindern sollen, gehören die Proteine der IAP (*inhibitor of apoptosis*) Familie. Besonderes Merkmal der IAP-Proteine sind eine unterschiedliche Zahl repetitiver Sequenzmotive, sogenannter BIR-Domänen (*baculovirus inhibitory repeat*). Abbildung 1.16 zeigt die am besten untersuchten IAP-Mitglieder.

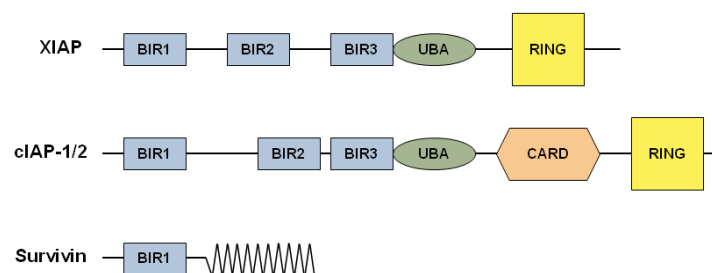


Abbildung 1.16 Mitglieder der IAP-Familie; Abbildung nach Altieri *et al.*¹²⁷; BIR – *baculovirus inhibitory repeat*; CARD – *Caspase recruitment domain*; UBA – Bindestelle für polyubiquitinierte Proteine.

Die BIR-Domänen sind für die Erkennung von Proteinen und Protein-Protein Interaktionen entscheidend¹²⁸, während die RING-Domäne als E3-Ubiquitin-Ligase fungiert und die CARD (*Caspase recruitment domain*)-Domäne bei cIAP1 bzw. cIAP2 die Funktion einer Rekrutierungsdomäne für Caspasen übernimmt¹²⁷.

XIAP, cIAP1 und cIAP2 weisen außerdem eine Bindestelle für IBM (*IAP binding motif*)-Proteine auf. Dieses Motiv kann bei Caspasen, wie Caspase 9 und 7, aber auch bei proapoptotischen Proteinen, wie SMAC (*second mitochondrial derived activator of caspase*), nachgewiesen werden^{129 130} und vermittelt die Interaktion der Proteine untereinander.

Physiologischerweise scheint lediglich XIAP Caspasen durch direkte Bindung zu inhibieren, indem es mit der katalytisch aktiven Region interagiert und die Substratbindung verhindert^{131 132}. Die in der RING Domäne verankerte E3-Ligase führt gleichzeitig zu einer Polyubiquitinierung und zum proteasomalen Abbau der betroffenen Caspasen^{133 134}. Demgegenüber scheinen cIAP1 und cIAP2 insbesondere bei der Regulierung der Initiator-Caspase 8 im Zusammenhang mit dem TNFR-Signaltransduktionsweg eine Rolle zu spielen und durch Ubiquitinierung der Caspasen sowie des Adaptorproteins RIP die Apoptose-Induktion negativ zu beeinflussen^{114 135 136} (Abschnitt 1.3.1.3. Punkt 3: TNFR/TNF α).

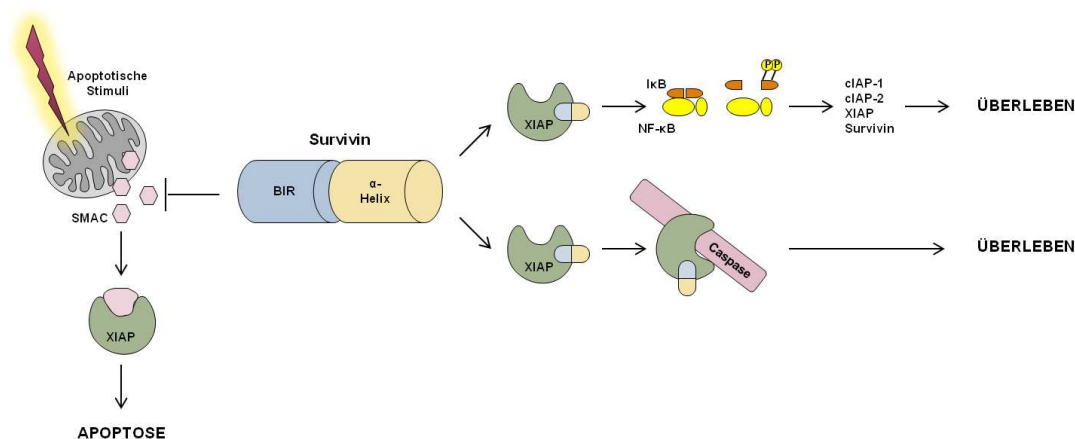


Abbildung 1.17: Schematische Darstellung der Survivin/XIAP Wechselwirkung und der daraus resultierenden antiapoptotischen Wirkung von Survivin.

Survivin, dem kleinsten Familienmitglied, fehlt im Gegensatz zu anderen IAPs eine katalytische Domäne. Die antiapoptotischen Effekte von Survivin scheinen vielmehr durch

Wechselwirkung mit anderen Proteinen vermittelt zu werden. So erhöht Survivin durch eine Komplexbildung mit XIAP dessen Stabilität gegenüber Ubiquitin-abhängiger Degradierung und verstärkt dadurch indirekt die Inhibierung der Caspasen durch XIAP^{137 138}. XIAP wiederum induziert die Transkription der IAP-Mitglieder durch Aktivierung des NF-κB-Weges^{139 140 141}, in Form einer positiven Rückkopplung (Abbildung 1.17)¹⁴². Desweiteren vermindert mitochondrial lokalisiertes Survivin die Freisetzung von proapoptotischem SMAC¹⁴³, das im Verlauf der intrinsischen Apoptose-Induktion aus den Mitochondrien ins Cytosol freigesetzt wird und über das IBM-Motiv cytosolische IAPs hemmt¹⁴⁴ (Abbildung 1.17). Survivin selbst wird u.a. durch die Stress-induzierten Chaperone Hsp60 und Hsp90 vor proteosomalem Abbau geschützt, was wiederum zur Apoptosehemmung beiträgt^{145 146}.

1.3.2 Die Rolle immunsupprimierender Mechanismen bei der Tumorabwehr und Therapieresistenz

Immunsupprimierende Eigenschaften von Tumorzellen und ihres Mikromilieus sind wesentlich für Tumorentstehung, Progression und Resistenz gegenüber immuntherapeutischen Strategien¹⁴⁷.

Ein typischer immunsuppressiver Tumor-„*escape*“-Mechanismus besteht im Verlust der MHC-I-Expression, der zu defekter Antigenpräsentation und fehlender Tumorerkennung durch spezifische zytotoxische T-Zellen führt^{148 149}. Bei vielen Tumoren ist gleichzeitig die Sensitivität gegenüber IFNγ herabgesetzt und somit die MHC-Induktion eingeschränkt^{150 151}. Bei fehlender MHC-I-Expression können natürliche Killerzellen (NK-Zellen) die betroffenen Zellen grundsätzlich eliminieren. Als Gegenmechanismus exprimieren Tumorzellen u.a. nicht-polymorphe MHC-Moleküle (HLA-E oder HLA-G), die wiederum die NK-Aktivität hemmen^{152 153}.

Die Expression koinhibitorischer Moleküle der CD28-Familie, z.B. PD-L1, auf Tumorzelloberflächen stellt einen weiteren verbreiteten „*escape*“-Mechanismus dar. Die Bindung von PD-L1 (B7H1) an seinen Rezeptor PD-1 auf aktivierten T-Zellen induziert Anergie und verhindert eine anti-tumöröse Immunantwort^{154 155}. PD-L1 ähnelt dem immunregulatorischen CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte associated antigen*), das auf T-Zellen exprimiert wird und nach Bindung an die Kostimulatoren B7.1 (CD80) oder B7.2 (CD86) ein inhibitorisches Signal vermittelt, wodurch die antigenspezifische T-Zellproliferation und IL-2 Produktion inhibiert werden. Antikörper zur Neutralisierung immunsupprimierender

Oberflächenmoleküle (z.B. gegen CTLA-4) gehören aktuell zu den vielversprechendsten Immuntherapeutika¹⁵⁶⁻¹⁵⁸.

Ein metabolischer, die T-Zell-Funktionen hemmender Mechanismus besteht in der Ausschüttung von Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO), wodurch die essentielle Aminosäure Tryptophan verbraucht und den T-Zellen die Proliferationsgrundlage entzogen wird^{197 198}.

Von Tumorzellen gebildetes Adenosin, Prostaglandin E2, IGFβ, IL-10 und VEGF-A supprimieren dendritische Zellen und fördern die Rekrutierung regulatorischer T-Zellen, die eine Anergie anti-tumorer Effektorzellen bewirken. Dementsprechend ist der Nachweis regulatorischer T-Zellen im Tumorgewebe häufig mit einer schlechten Prognose assoziiert⁴⁴.

Neben T_{reg}- werden auch MDS (*myeloid derived suppressor*)-Zellen für die Inhibierung der Immunantwort verantwortlich gemacht und können durch die Produktion von Arginase und NO-Synthetase T-Zellen supprimieren⁴³.

1.3.3 Skelettmuskulatur als immunologisches System

Analysen inflammatorischer Myopathien haben gezeigt, dass Skelettmuskulatur zahlreiche immunologisch relevante Oberflächenmoleküle exprimieren kann¹⁵⁹. Unter Entzündungsbedingungen werden von Myoblasten z.B. kostimulatorische und adhäsive Oberflächenmoleküle in Kombination mit Matrix-Metalloproteasen (MMP) und Chemokinen gebildet, sodass vermutet wird, dass quergestreifte Muskulatur aktiv an lokalen Immunreaktionen teilnehmen kann¹⁶⁰.

In vitro sind Myoblasten gegenüber der Stimulation verschiedener Chemokine sensibel und können im Falle entzündlicher Prozesse maßgeblich die Expression von MHC und kostimulatorischen Molekülen, ebenso wie von Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1), Zytokin- und Chemokinrezeptoren ändern^{161 162} und als nicht-professionelle APC fungieren^{160 163-165}. Dabei spielt für die Interaktion mit CTLs insbesondere die Expression des nicht-klassischen Kostimulators ICOS-L eine Rolle, da die beiden essentiellen Kostimulatoren, B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) in der Skelettmuskulatur nicht induzierbar sind¹⁶⁶⁻¹⁶⁹. Gleichzeitig konnten mehrere inhibitorische Oberflächenmoleküle, wie HLA-G^{170 171}, B7H1 und B7H3 nachgewiesen werden, welche die Skelettmuskulatur vor einem Angriff durch das Immunsystem schützen können^{65 172 173}. Die Muskulatur stellt dem Immunsystem somit die nötigen Moleküle für eine ausreichende Stimulation zur Verfügung und wird gleichzeitig durch die Expression inhibitorischer Moleküle vor einem Angriff durch das Immunsystem geschützt.

1.4 Immuntherapeutische Ansätze – allgemeine Übersicht

Trotz der Weiterentwicklung von Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie in den vergangenen 40 Jahren und stetiger Verbesserung der Überlebensraten¹⁷², stellen fortgeschrittene oder rezidierte Tumoren und minimale Resterkrankungen ein großes Problem dar⁵⁶. Einen Lösungsansatz bieten immunologische Therapien, die im Gegensatz zur Chemo- und Strahlentherapie auch mitotisch nicht aktive Tumorzellen eliminieren können. Gleichzeitig bleibt - zumindest theoretisch - je nach Tumorspezifität des Zielantigens, die Wirkung der Therapie auf das Tumorgewebe weitgehend beschränkt, wodurch Nebenwirkungen reduziert werden⁵⁶.

Zurzeit werden drei immuntherapeutische Ansätze verfolgt: (1) Die unspezifische Stimulation des Immunsystems, (2) die aktive Immunisierung mit Tumorantigenen und (3) der adoptive Zelltransfer¹⁷³ (Abbildung 1.18).

Bei der unspezifischen Immunstimulation wird angestrebt, die Anti-Tumor-Immunantwort zu induzieren oder zu verbessern. Dazu wurde in den 90er-Jahren von der FDA (*Food and Drug Administration*) Interleukin-2 (IL-2), ein Wachstumsfaktor für Lymphozyten und NK-Zellen, zur Behandlung von Nierenzellkarzinomen und Melanomen zugelassen^{173 174}. IL-2 zeigte allerdings nur bei 10-15% der behandelten Patienten eine dauerhafte Regression des Tumorwachstums¹⁷³.

Impfstoffe gegen Viruserkrankungen wie Hepatitis B oder humanes Papillomavirus dienen der Prävention von Tumoren, die mit diesen Erkrankungen assoziiert sind^{175 176}. Im Gegensatz dazu sollen therapeutische Vakzine eine Immunantwort gegen einen schon bestehenden Tumor induzieren. Als therapeutische Vakzine gelten spezifische Tumorantigene, die als Peptidfragmente oder Gesamtprotein dazu dienen sollen, im Körper eine Immunantwort zu induzieren. Problematisch hierbei ist allerdings das wirtsspezifische Prozessieren der TAA, sodass dasselbe TAA infolge der verschiedenen, in der Bevölkerung vertretenen, HLA-Subtypen unterschiedlich präsentiert wird. Die Generierung therapeutischer Vakzine erfordert somit sowohl eine genaue Kenntnis der TAA-Peptidsequenz als auch des präsentierenden HLA-Subtyps. Klinische Studien mit solchen Peptid/Protein-Vakzinen erzielten bei verschiedenen Tumorentitäten bereits Erfolge. Ein Schwachpunkt dieser Protein-basierten Vakzine ist allerdings die oftmals nur eingeschränkte Stimulation von Effektor-T-Zellen und somit eine ineffektive anti-Tumorstimmung^{147 177 178}.

Durch die Verwendung dendritischer Zellen, die als professionelle APCs zytotoxische T-Zellen zur Proliferation stimulieren, soll diese Problematik umgangen werden. Dabei werden APCs aus den Patienten isoliert und mit einem spezifischen Tumorantigen

kokultiviert bevor sie den Patienten reinjiziert werden. Ziel ist es, durch „professionell“ präsentierte Tumorantigene körpereigene, zytotoxische T-Zellen gegen den Tumor zu sensibilisieren und diesen dadurch zu eliminieren^{179 56 147 177} (Abbildung 1.18 (D)). Gerade bei Prostatakarzinomen wurden mit diesem Ansatz gute Erfolge erzielt^{180 181}.

In abgewandelter Form können statt APCs auch T-Zellen aus Patienten isoliert und *ex vivo* mit APCs kokultiviert werden, sodass stark immunogene Zellklone isoliert und wieder den Patienten injiziert werden können. Ein solcher Transfer von anti-tumorösen Immunzellen wird als „Adoptive Zelltherapie“ (ACT, *adoptive cell therapy*) bezeichnet. Zu dieser Strategie zählen auch der Transfer tumorinfiltrierender Lymphozyten (TIL) oder genetisch modifizierter Lymphozyten.

Tumorinfiltrierende Lymphozyten sind autologe Lymphozyten mit einer anti-Tumor-Aktivität, die direkt aus resezierten Tumoren isoliert und *in vitro* expandiert werden (Abbildung 1.18 (C)). Bei Melanompatienten hat sich gezeigt, dass TILs unter Produktion diverser Zytokine, wie IL-2, IFN γ und TNF α , effektiv Tumorzellen lysieren und eine dauerhafte Regression des Tumorwachstums bewirken können^{182 183}. Eine Lymphozyten-Depletion vor der Re-Injektion der TILs kann die Effektivität der Behandlung stark verbessern, da hierdurch auch, die Immunreaktion supprimierende, regulatorische T-Zellen und MDSC (*myeloid derived suppressor cells*) abgetötet werden¹⁸⁴. Die Isolierung von TILs ist allerdings sehr aufwendig und gestaltet sich bei nicht resezierbaren oder sehr kleinen Tumoren als schwierig, wodurch die Möglichkeiten dieser ACT auf große, gut erreichbare Tumore beschränkt bleiben^{173 185}.

Die genetische Modifikation von peripheren Blutlymphozyten (PBL) mit Rezeptoren, die spezifisch Tumorantigene erkennen, umgeht viele der oben aufgezeigten Probleme. PBLs können leicht aus Vollblut isoliert, expandiert und mittels retroviralem Gentransfers modifiziert werden, um anschließend dem Tumorpatienten wieder injiziert zu werden. Die Modifikationen können aus einem spezifischen T-Zell-Rezeptor¹⁸⁶ oder einem chimären Antigenrezeptor (CAR) bestehen (Abbildung 1.18 (B)). Antigenrezeptoren besitzen im Gegensatz zu TCR den Vorteil, nicht auf eine Antigenpräsentation über MHC-I- oder MHC-II-Komplexe angewiesen zu sein und bestehen in der Regel aus einem „*single chain*“-Fragment eines monoklonalen Antikörpers, das genetisch mit einem intrazellulären Signalmolekül eines T-Zell-Rezeptors verknüpft ist¹⁸⁷.

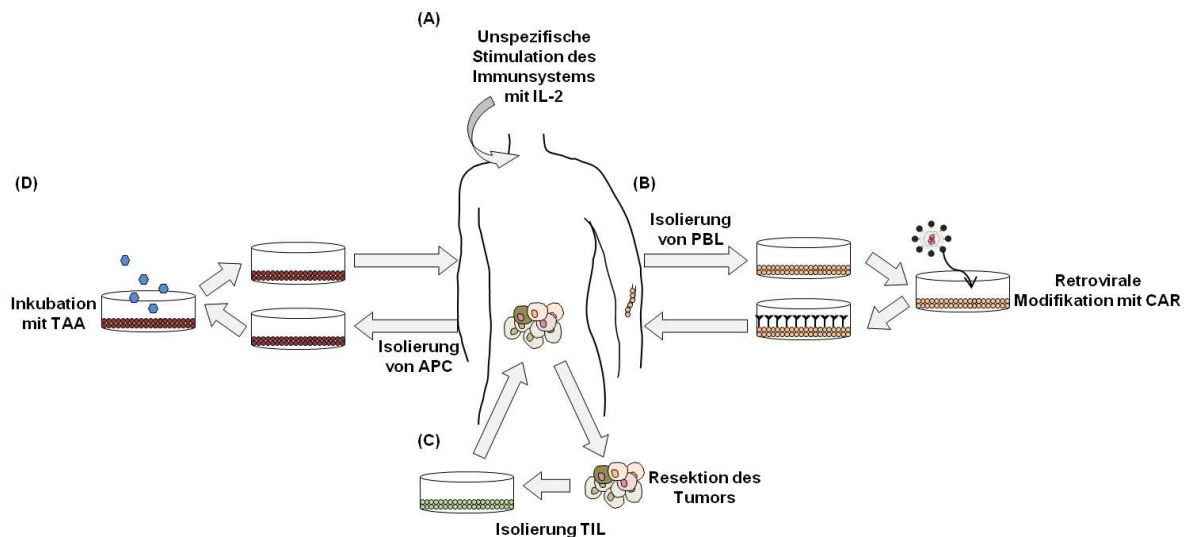


Abbildung 1.18: Darstellung verschiedener immuntherapeutischer Ansätze zur Tumorbekämpfung. (A) Unspezifische Stimulation mit IL-2, (B) Isolierung und genetische Modifikation peripherer Blutlymphozyten (PBL), (C) Isolierung und Expansion von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) sowie (D) die Modifikation von Antigen-präsentierenden Zellen (APC).

Die antigenbindende Domäne des CAR setzt sich aus den variablen Anteilen der leichten (V_L) und schweren Kette (V_H) eines monoklonalen Antikörpers zusammen, der spezifisch ein bestimmtes Tumorantigen erkennt. Zur Erzeugung des chimären Rezeptors werden die beiden Domänen der leichten und schweren Kette über einen flexiblen Linker verknüpft. Das entstandene künstliche Fragment wird als „*single chain variable*“-Fragment (scFv) bezeichnet. Damit die scFv-Fragmente zur Erkennung spezifischer Antigene eine ausreichende Beweglichkeit aufweisen, werden sie über eine variable „*hinge*“-Region an die Transmembrandomäne des CAR angefügt¹⁸⁸. Die Transmembrandomäne wiederum ist meist Teil eines CD4-, CD8-, CD28- oder CD3-Membranproteins (Abbildung 1.19). An die Transmembrandomäne schließt sich eine intrazelluläre Signaldomäne an, die bei der Bindung des CAR an das entsprechende Antigen, die T-Zell-vermittelte Lyse der Tumorzelle initiiert (Abbildung 1.19).

Bei den Rezeptoren der ersten Generation hat sich die Verwendung einer CD3 ζ -Signaltransduktionskette durchgesetzt¹⁸⁹. Für eine ausreichende Aktivierung und Proliferation benötigen T-Zellen, wie unter Abschnitt 1.3.1.2 beschrieben, ein kostimulatorisches Signal. Dazu wird den Rezeptoren der zweiten Generation als Teil der Transmembrandomäne oder unmittelbar danach, eine kostimulatorische Domäne, wie CD28 oder ICOS-L, eingefügt (Abbildung 1.19). Die generierten Rezeptoren zeigen eine verstärkte Proliferation, erhöhte Zytokinproduktion (IFN γ und IL-2) und dadurch eine verbesserte Anti-Tumor Aktivität^{190 191}. Die Weiterentwicklung der chimären Rezeptoren strebt die

Erzeugung von Varianten an, die mit der Erkennung ihres Target-Antigens, neben verbessertem Proliferationsverhalten auch erhöhte Überlebensraten aufweisen, sodass die Verweildauer im Körper verlängert und die Effizienz der Tumorzelllyse verbessert wird (dritte Generation)¹⁹² (Abbildung 1.19).

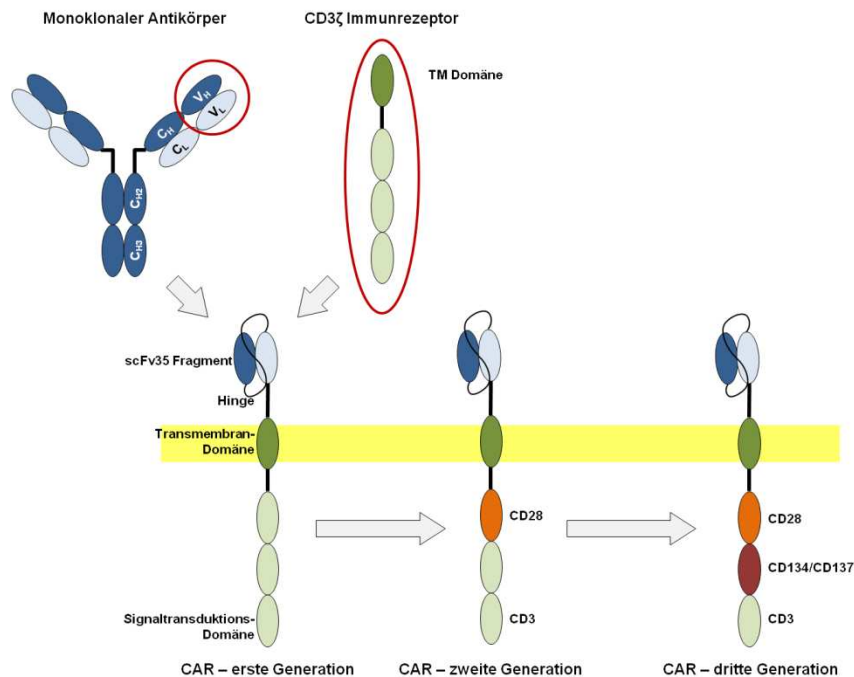


Abbildung 1.19: Schematischer Aufbau chimärer Antigenrezeptoren (CAR) der ersten (links), zweiten (Mitte) und dritten Generation (rechts) (nach Cartellieri *et al.*¹⁸⁵).

Die Eigenschaft der Lymphozyten, Gewebe aktiv zu penetrieren und Zellen auf die Anwesenheit des spezifischen Antigens zu „scannen“, macht chimäre T-Zellen sehr effektiv¹⁹³. Im Gegensatz zur Isolierung von TILs oder APCs bieten chimäre T-Zellen den Vorteil, in kurzer Zeit (1-2 Wochen) aus relativ kleinen Blutmengen (25-50 ml) eine große Zahl rezeptortragender TAA-spezifischer T-Zellen generieren zu können¹⁸⁵.

Mehrere *In-vivo*-Studien konnten bereits nachweisen, dass die so modifizierten T-Zellen Tumorzellen spezifisch erkennen und lysieren (Abbildung 1.20). Erste Klinische Studien, bei denen chimäre T-Zellen zur Bekämpfung von Melanomen eingesetzt worden waren, zeigen vielversprechende Ergebnisse^{194 195}.

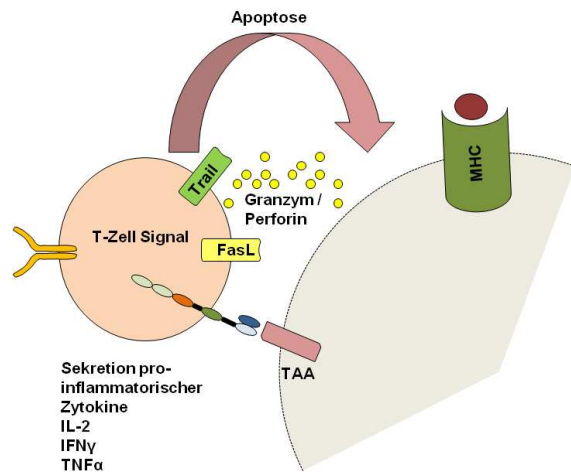


Abbildung 1.20: Tumorzelllyse durch chimäre T-Zellen. Der auf T-Zellen exprimierte, künstlich erzeugte chimäre Antigenrezeptor, erkennt MHC-I unabhängig Tumorantigene und führt zur Zelllyse der Tumorzelle durch die T-Zelle (nach Cartellieri *et al.*¹⁸⁵).

1.5 Konventionelle und immuntherapeutische Ansätze bei RMS

Die Prognose eines Rhabdomyosarkoms ist nicht nur vom histologischen Subtyp abhängig, sondern auch von der Lokalisation des Primärtumors, dem Stadium der Erkrankung sowie dem Alter zum Zeitpunkt der Diagnose¹⁹⁶. Eine Tumorlokalisation im Bereich des Urogenitaltraktes, Kopfes oder Halses sowie weniger als zwei Metastasen sind mit einer günstigen Prognose assoziiert, während sich die Prognose mit steigendem Alter und Entwicklung von Knochen- oder Knochenmarks-Metastasen stark verschlechtert^{197 198}.

Die Behandlung von Rhabdomyosarkomen spielt eine entscheidende Rolle für die Prognose von RMS. Zurzeit kommt meistens eine Kombination aus Strahlen- und Polychemotherapie und je nach Möglichkeit eine Tumoresektion zur Anwendung. Dabei ist die Zusammensetzung der Therapie eine Gratwanderung zwischen effektiver Tumorbekämpfung und der Verträglichkeit der Behandlung, da Strahlen- und Chemotherapie schwere Auswirkungen auf den kindlichen Organismus haben^{199 200 201}. Therapiekonzepte, die hohe Effektivität mit guter Verträglichkeit der verwendeten Chemotherapeutika und Strahlentherapie verbinden, haben im Verlauf der letzten 20 Jahre die Prognose lokalisierter RMS-Tumore stark verbessert^{1 202-205}. Im Vergleich dazu sind die Behandlungserfolge bei metastasierenden RMS gering geblieben. Trotz medizinischer Neuerungen stagniert die Überlebensrate dieser Hochrisikopatienten seit vielen Jahren bei nur 20-30%^{196 197 201 205}. Dies hat zur Suche nach grundsätzlich neuen Therapiekonzepten (z.B. immunologischen Verfahren) geführt, deren Einsatz als Rezidivprophylaxe oder in Kombination mit „klassischen“ Therapiestrategien denkbar ist bzw. bereits erprobt wird^{206 207}. Die Wirksamkeit immunologischer Therapiestrategien hängt dabei u.a. vom Tumormikromilieu und der Balance zwischen immunsupprimierenden und -stimulatorischen Eigenschaften ab.

1.5.1 Tumorantigen bei RMS

Die Wahl des Tumorantigens ist bei Immuntherapien von entscheidender Bedeutung, um die Nebeneffekte auf andere Gewebe gering zu halten. Da immuntherapeutische Ansätze sehr spezifisch für ein Antigen sind, sollten solche Antigene verwendet werden, die einzig auf Tumorzellen exprimiert werden⁵⁶. Für Rhabdomyosarkome wurde der fetale Acetylcholinrezeptor (fAChR) als spezifisches Antigen beschrieben^{208 209}.

Beim AChR handelt es sich um einen pentameren Kationenkanal der Skelettmuskulatur, der aus vier verschiedenen Untereinheiten besteht (Isoformen: $\alpha_2\beta\delta\epsilon$ oder $\alpha_2\beta\delta\gamma$)²¹⁰ und für die neuromuskuläre Reizübertragung verantwortlich ist. Dabei unterschieden sich muskuläre AChR grundsätzlich sowohl in funktioneller als auch immunologischer Hinsicht von neuronalen AChR²¹¹. Abhängig vom Entwicklungsstand der neuromuskulären Endplatte wird eine fetale (fAChR) und eine adulte AChR (aAChR) Variante unterschieden. Die fetale Form des AChR mit der pentameren Zusammensetzung $\alpha_2\beta\delta\gamma$ enthält eine γ -Untereinheit (UE), die bis zur 31-sten Schwangerschaftswoche durch die homologe ϵ -UE des adulten Rezeptors ausgetauscht wird, sodass eine $\alpha_2\beta\delta\epsilon$ -Zusammensetzung resultiert²¹²⁻²¹⁴, die für eine veränderte Leitfähigkeit des Ionenkanals verantwortlich ist²¹⁵ (Abbildung 1.21).

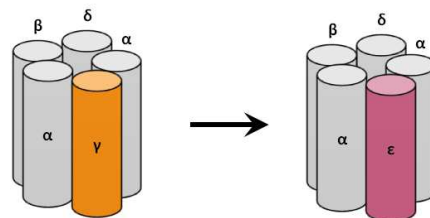


Abbildung 1.21: Austausch der γ UE des AChR gegen die ϵ UE, der bis zur 31-sten Schwangerschaftswoche erfolgt.

Nach der Geburt wird der fetale AChR physiologischerweise nur noch von einigen (nicht innervierten) Myoidzellen des Thymus^{216 217} und – aus unbekannten Gründen - in einzelnen innervierten Fasern der extraokulären Muskulatur²¹⁸ exprimiert. Zu einer Re-Expression des fAChR nach der Geburt kommt es nur im Falle einer Denervierung²¹⁹, nicht jedoch im normal innervierten Muskel²¹⁴.

Autoantikörper gegen den fAChR können als große Rarität bei schwangeren Frauen nachgewiesen werden²²⁰, deren ungeborene Kinder von einer Erkrankung betroffen sind, die als *Arthrogryposis multiplex congenita* (AMC) bezeichnet wird (und meistens durch genetische Ursachen bedingt ist). Die autoimmunologische Form der AMC wird durch Autoantikörper verursacht, die eine schwere intrauterine Muskelschwäche und

Bewegungsarmut mit Gelenkfehlstellungen und Versteifungen bedingen, die so schwer sein können, dass sie mit dem Leben nicht vereinbar sind²²¹. Bei einigen Fällen autoimmunologisch-bedingter AMC konnte durch Versuche mit transfizierten, AChR-exprimierenden *Xenopus*-Eiern gezeigt werden, dass sich im Blut der Mütter ausschließlich Antikörper gegen die γ -UE des fetalen AChR befanden und diese Autoantikörper keinerlei Einfluss auf die adulte Variante des AChR besaßen²²¹. Aufgrund der stark eingeschränkten Expression des fAChR in adultem Gewebe zeigten die Mütter keinerlei eigene Symptome, während die Kinder neben AMC oftmals von einer neonatalen Myasthenie (*Myasthenia gravis*) betroffen waren²²²; also einer durch die Antikörper begründeten ausgeprägten Muskelschwäche, die mit dem Austausch der γ -UE gegen die ϵ -UE des adulten AChR verschwanden.

Diese inzwischen wiederholt gemachte Beobachtung beim Menschen legt den Schluss nahe, dass die von RMS exprimierte AChR γ -UE ein vielversprechendes, weil postnatal nahezu RMS-spezifisch exprimiertes Tumorantigen ist^{208 209} und gegen den fAChR gerichtete immuntherapeutische Strategien geringe Nebenwirkungen auf den Organismus, speziell die innervierte Skelletmuskulatur, haben dürften.

1.6 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit sollte dazu dienen, einen immunologischen Therapieansatz zur Behandlung von Rhabdomyosarkomen auf Basis chimärer T-Zellen zu etablieren. Als Zielantigen für die chimären T-Zellen wurde der von RMS-Tumoren spezifisch exprimierte fAChR genutzt. In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass ein fAChR-spezifischer Antigenrezeptor der ersten Generation RMS-Zellen zwar erkennen, jedoch nur mit geringer Effektivität lysieren konnte²²³. Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen die Optimierung dieses Rezeptors und eine damit verbundene Effektivitätssteigerung der chimären T-Zellen.

Zusätzlich wurden die bis dahin wenig untersuchten immunologischen Eigenschaften von RMS-Tumoren auf der Grundlage bekannter muskelspezifischer Mechanismen analysiert. Dabei waren die immunologisch relevanten Oberflächenmoleküle der Skelettmuskulatur, aufgrund der muskulären Differenzierung von RMS von besonderem Interesse und dienten als Anhaltspunkt, um die Wechselwirkung zwischen RMS und Immunsystem zu erforschen. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die Analyse der bekannten immunsupprimierenden und -stimulatorischen Eigenschaften gelegt, die für immunologische Therapiekonzepte eine Rolle spielen könnten.

Ferner wurde nach möglichen Resistenzmechanismen gesucht, die RMS-Tumore vor einer Apoptose-Induktion durch zytotoxische T-Zellen schützen könnten. Neben Analysen zur Sensitivität gegenüber den bekannten Todesrezeptor-Liganden (FAS-L, TRAIL und TNF α) wurden die RMS-Zelllinien und RMS-Gewebe auf die Expression bekannter antiapoptotischer Moleküle untersucht.

Ein Überblick über die von RMS exprimierte Oberflächenmoleküle und zellinternen, antiapoptotischen Mechanismen sollte helfen das Verständnis für die Entstehung von RMS-Tumore zu verbessern und potenzielle „*immune escape*“-Mechanismen aufzudecken. Die Erkenntnisse sollten außerdem dazu dienen, die chimäre T-Zelltherapie weiter zu entwickeln und für einen möglichen *In-vivo*-Einsatz zu optimieren.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

Die im Verlauf der Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind im Anhang aufgelistet.

2.1.1 Antikörper

In Tabelle 2.1 sind die im Verlauf der Arbeit verwendeten Primärantikörper, in Tabelle 2.2 die Sekundärantikörper alphabetisch aufgelistet.

Tabelle 2.1: Primärantikörper

<i>Antigen</i>	<i>Spezies, (Klon)</i>	<i>Bezugsquelle</i>
AChR, γ -UE	rat anti-human, mAB (66)	Pasteur Institut, Athen, Griechenland
AChR, α -UE	rat anti-human, mAB (198)	Pasteur Institut, Athen, Griechenland
AChR, γ -UE	mouse anti-human, mAB (C9)	GeneTex, Irvine, CA, USA
AChR, α -UE	mouse anti-human, mAB (D6)	GeneTex, Irvine, CA, USA
Aktin	mouse anti-human, mAB (C4)	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
B7H1 (CD274)	mouse anti-human, mAB, (130021)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Caspase 8	mouse anti-human mAB, (1C12)	cell signaling, Beverly, MA, USA
CIITA	goat anti-human, pAB, (A19)	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
CD3	mouse anti-human, mAB, (OKT-3)	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD28	mouse anti-human, mAB, (L293)	BD, San Jose, CA, USA
CD28	mouse anti-human, mAB, (CD28.2)	BD, San Jose, CA, USA
CD54	mouse anti-human, mAB, (BBIG-I1)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
cIAP1	rabbit anti-human, mAB (D5G9)	cell signaling, Beverly, MA, USA
cIAP2	Rat anti-human mAB (16E-6-3)	Enzo Life Science, Farmingdale, NY, USA
CTLA-4 (CD152)	goat anti-human, pAB	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
FAS-Ligand	mouse anti-human, mAB (B-R17)	abcam, Cambridge, UK
HLA-G	mouse anti-human, mAB (MEM-G/9)	Exbio, Vestec u Prahy, Tschechien
ICOS-Ligand (CD274)	mouse anti-human, mAB (2D3)	Acris, Herford, Deutschland
IFN γ -R1	mouse anti-human, mAB (92101)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
IFN γ -R2	goat anti-human, pAB	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Survivin	rabbit anti-human, pAB	abcam, Cambridge, UK
XIAP	rabbit anti-human, pAB	abcam, Cambridge, UK

Tabelle 2.2: Sekundärantikörper und direkt markierte Primärantikörper

<i>Antigen</i>	<i>Spezies, (Klon)</i>	<i>Markierung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
CD2	mouse anti-human, mAB, (S5.5)	FITC	Caltag, Burlingame, CA, USA
CD3	mouse anti-human, mAB, (3B5)	TRI	Caltag, Burlingame, CA, USA
CD11a	mouse anti-human, mAB, (MEM-25)	PE	Caltag, Burlingame, CA, USA
CD16	mouse anti-human, mAB, (GRM1)	PE	immunostep, Salamanca, Spanien
CD18	mouse anti-human, mAB (CLB-LFA-1/1)	FITC	Caltag, Burlingame, CA, USA
CD25	mouse anti-human, mAB, (CD25-3G10)	FITC	Caltag, Burlingame, CA, USA
CD56	mouse anti-human, mAB (B-A19)	FITC	immunostep, Salamanca, Spanien
CD58	mouse anti-human mAB (1C3)	PE	BD, San Jose, CA, USA
CD69	mouse anti-human, mAB (L78)	FITC	BD, San Jose, CA, USA
CD80	mouse anti-human, mAB (L307.4)	PE	BD, San Jose, CA, USA
CD86	mouse anti-human, mAB (IT2.2)	PE	BD, San Jose, CA, USA
IgG (H+L)	donkey anti-goat	FITC	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
IgG + IgM (H+L)	goat anti-human	FITC	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
IgG	goat anti-mouse	FITC	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
IgG	mouse anti-human	PE	SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA
IgG	donkey anti-rabbit	Cy3	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
IgG (H+L)	donkey anti-rat	FITC	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Isotyp-Kontrolle IgG1	mouse (MOPC-21)	PE	BD, San Jose, CA, USA
Isotyp-Kontrolle IgG1	mouse (MOPC-21)	APC	BD, San Jose, CA, USA
Isotyp-Kontrolle IgG1	mouse	PE	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isotyp-Kontrolle IgG1	mouse	FITC	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Isotyp-Kontrolle IgG2b	mouse	PE	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
IgG	goat anti-mouse	HRP	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
IgG	goat anti-rabbit	HRP	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
IgG	rabbit anti-goat	HRP	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
IgG	rabbit anti-sheep	HRP	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA

2.1.2 Zytokine

Tabelle 2.3: Zytokine

<i>Zytokin</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Interferon- γ (human)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Interferon- γ (human)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Interleukin-1a (human)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Proleukin [®] S (Interleukin-2)	Novartis, Basel, Schweiz
TNF α (human)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

2.1.3 Kits

Tabelle 2.4: Kits

<i>Kit</i>	<i>Bezugsquelle</i>
RevertAid [™] H Minus First Strand cDNA Synthesis	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
Gentra Purgene	Qiagen, Hilden, Deutschland
IFN γ ELISA-Kit	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
Granzym B ELISA-Kit	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
EndoFree Plasmid Maxi-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Neon [™] Transfection System 100 μ l Kit	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
BigDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing-Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

2.1.4 Transfektionsreagenzien

Zur Transfektion der in Tabelle 2.5 aufgeführten Säugerzellen mit siRNA wurde HiPerFect der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet.

2.1.5 Zelllinien

Tabelle 2.5: Zelllinien und Zelllinien-spezifische Kultivierungsbedingungen

<i>Typ</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Kultivierungsbedingung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
CRL2061	ARMS	RPMI/10% FBS	ATCC*, Menasses, VA, USA
RH30	ARMS	RPMI/10% FBS	DSMZ**, Braunschweig, Deutschland
RH41	ARMS	RPMI/10% FBS	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
FLOH1	ARMS	RPMI/10% FBS	Olgahospital, Stuttgart, Deutschland
RD6	ERMS	DMEM/10% FBS	ATCC, Menasses, VA, USA
TE671	ERMS	DMEM/10% FBS	ATCC, Menasses, VA, USA
MITC	Thymusmyoid-Zelllinie	RPMI/10% FBS	Institut für Physiologie (Thymus), Le Plessis Robinson, Frankreich
Hela	Cervix-Karzinom-Zelllinie	DMEM/10% FBS	ATCC, Menasses, VA, USA
293T	Humane embryonale Nieren-Zelllinie	DMEM/10% FBS	ATCC, Menasses, VA, USA
HT29	Colonkarzinom-Zelllinie	DMEM/10% FBS	DSMZ, Braunschweig, Deutschland

* ATCC – American Type Culture Collection

** DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen;

2.1.6 Zellkulturmedien und –reagenzien

Tabelle 2.6: Zellkulturmedien und -reagenzien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
RPMI1640	PAA, Cölbe, Deutschland
DMEM, high glucose (4,5 g/L), (+) sodium pyruvat	PAA, Cölbe, Deutschland
DMEM/Ham's F12	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
MEM (mit Earle's Salt)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
FBS	PAA, Cölbe, Deutschland
NEA (<i>non essential amino acids</i>)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Penicillin / Streptomycin	PAA, Cölbe, Deutschland
Trypsin (0,5 mg/ml) EDTA (0,22 mg/ml)	PAA, Cölbe, Deutschland
PBS	Eigenherstellung

2.1.7 Mikroorganismen

Die Amplifikation von Plasmiden erfolgte unter Verwendung chemisch kompetenter Bakterien des Stammes DH5 α (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

2.1.8 Plasmide

Zur Generierung des in der Arbeit verwendeten fAChR-spezifischen „*single chain*“-Fragmentes wurde im Vorfeld ein humanes rekombinantes Fab-Fragment, Fab35, welches spezifisch für die γ -Untereinheit des fAChR war, via Phagen Display isoliert²²³. Die variablen Domänen v_H und v_L wurden mittels PCR zu einem scFv-Fragment zusammengefügt und „*in frame*“ an ein IgG-„*hinge*“-Fragment und eine humane CD3 ζ -Kette angefügt. Der chimäre Rezeptor wurde in einen retroviralen SFG-Vektor umklontiert²²⁶.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde das „*single chain*“-Fragment mittels PCR mit einer *RcaI* und einer *BamHI* Restriktionsschnittstelle versehen. Der „*sense*“-Primer codiert zusätzlich für eine spezifische Maus-„*leader*“-Sequenz, die dem Export des Rezeptors dient. Das „*single chain*“-Fragment wurde über die beschriebenen Restriktionsschnittstellen in den BW431/26scFv-Fc-CD3 ζ und den BW431/26scFv-Fc-CD28-CD3 ζ -CAR kloniert¹⁹⁰. Beide Rezeptoren tragen die Information für eine humane IgG1-„*hinge*“-Domäne und eine humane CD3 ζ -Kette, wobei das zweite Konstrukt zusätzlich eine CD28-Transaktivierungsdomäne trägt. Zur retroviralen Expression des chimären Antigenrezeptors (CAR) in peripheren Blutlymphozyten (PBL) diente der pBULLET-Vektor²²⁷.

Das in der Arbeit verwendete CD54-Konstrukt (pcDNA3.1-Vektor, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wurde uns freundlicherweise von Herrn PD Dr. Frank Momburg (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Die verschiedenen AChR-Untereinheiten stammen aus dem Labor von Prof. Dr. David Beeson (University of Oxford, Oxford, GB) und sind ebenfalls Bestandteil eines pcDNA3.1-Plasmides.

2.1.9 Primer

Die im Folgenden aufgeführten Primer wurden zur Klonierung des „*single chain*“-Fragmentes eingesetzt. Die kursiv dargestellten Nukleotide entsprechen den verwendeten Restriktionsschnittstellen (Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7: Klonierungsprimer für den chimären Antigenrezeptor

Bezeichnung	Sequenz
<i>leader + scFv35v_Lv_H (forward Primer)</i> (Annealing-Temperatur: 55 °C)	5' TGA CAA TCA TGA ATT TTC AGG TGC AGA TTT TCA GCT TCC TGC TAA TCA GTG CCT TCA GTC ATA ATG TCT AGA GTG ATG ACC CAG TCT CAT CCT CCC 3'
scFv35v _H v _L (reverse Primer) (Annealing-Temperatur: 55 °C)	5' TAA TAG GAT CCG GAG AGA CGG TGA CCG TTG T 3'

Alle weiteren im Rahmen der Arbeit verwendeten Primer wurden so konstruiert, dass die Anlagerung der Primer an die Zielsequenz (Primer-*Annealing*) bei 60 °C erfolgt.

Tabelle 2.8 listet die verwendeten Sequenzierprimer auf.

Tabelle 2.8: Sequenzierprimer

Bezeichnung	Sequenz
IFNGR1 Seq fwd	CTGACTGATTGATGGCAGGT
IFNGR1 Seq rev	AGAATTGCAGAGCTGGGAAG
CMV Promotor	AGTGTATCATATGCCAAGTACG
pBullet fwd	TTACACAGTCCTGCTGACC
pBullet rev	ATGTGAAGGGCGTCGTAGG
hIgG innen fwd	CTGACAAAACCTCACACATGC
hIgG innen rev	GGAAGAGGAAGACTGACGG
CD3 innen rev	CATCCCAATCTCACTGTAGG

fwd - *forward*; rev – *reverse*

Weitere Primer, die im Verlauf der Arbeit für PCR- und qRT-PCR-Analysen eingesetzt wurden, sind in Tabelle 2.9 aufgeführt.

Tabelle 2.9: PCR und qRT-PCR Primer

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz fwd* Primer</i>	<i>Sequenz rev* Primer</i>
AChR α	AACACACACCAACCGCTCAC	CTCGATGGCACTTTTCACCT
AChR γ	CTGTGCAGGACACCCAGTC	CGGGCCTTTCTCTAGCTTCT
AChR α (Duplex-PCR)	AAGCTACTGTGAGATCATCGT	TGACGAAGTGGTAGGTGATGT
AChR γ (Duplex-PCR)	TACTTGCTGATGAGTGGCACC	ATCTCAGTCACCTACTTCCCC
AuroraB Kinase	GCCCACCTGCACCATCCCAAC	TCGTGGCTGTTTCGCTGCTCG
B7-1 (CD80)	AGCAGTAGGTCAGGCAGCAT	GACAACCAACCACAGCTTCA
B7-2 (CD86)	TGGAACCAACACAATGGAGA	TTAAAAACACGCTGGCTTC
B7H1	TGGTGGTGCCGACTACAAGCG	TCGGCCTTGGGGTAGCCCTC
B7H3	GTGGGGCTGTCTGTCTGTCT	CTCAGCTCCTGCATTCTCCT
Bax	CCCCCGAGAGGTCTTTTTC	CCGGAGGAAGTCCAATGTC
Bcl-2	GAGGATTGTGGCCTTCTTTG	GTGCCGGTTCAGGTACTCAG
Bcl-xl	GTAAACTGGGGTCGCATTGT	TGCTGCATTGTTCCCATAGA
Bid	GCTTGGAAGAATAGAGGCAGAT	GATGCTACGGTCCATGCTGT
Bim	TCAACACAAACCCCAAGTCC	GTCTCCAATACGCCGCAAC
cFLIP	GGCCGCGACAGGACGAACTC	TGCAGTACAGCTCCGGGCCA
cIAP1	CCAAGTGTTTCCAAGGTGT	GGTGGGTCAGCATTTTCTTC
cIAP2	CCGTCAAGTTCAAGCCAGTT	TGGTCTTCTCCAGGTTCAAAA
FAS	TGCACCCGGACCCAGAATACCA	CTGGATCCTTCCTCTTTGCACTTGG
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
ICAM1 (CD54)	AGGCCACCCAGAGGACAAC	CCCATTATGACTGCGGCTGCTA
IFNGR1 JAK	CTGACTGATTGATGGCAGGT	AGAATTGCAGAGCTGGGAAG
IFNGR1 STAT	GGAGGTGGTCTGTGAAGAGC	TCTTTACCGCTATCATCCACAA
Mcl-1	CCAAGAAAGCTGCATCGAAC	AGAACTCCACAAACCCATCC
MHC-I	GAGGCAAGAGTTGTTTCCTGC	CTCCCCACCTCCTCACATTA
MHC-II	TGTAAGGCACATGGAGGTGA	ATAGGGCTGGAAAATGCTGA
Noxa	CACCCCATCGCCTCCTTTCT	TCCTGAGCAGAAGAGTTTGGA
Pax3-FKHR	AGCTACCCGAGGCCCGAGT	AACTGTGATCCAGGGCTGTC
Puma	GCGGAGACAAGAGGAGCA	CCAGGGTGTGAGGAGGTG
SMAC	AGTAACCCTGTGTGCGGTTC	GCTGCCATCTCTGAAAGACC
SOCS1	TGGTAGCACACAACCAGGTG	GAGGAGGAGGAAGAGGAGGA
Survivin	GTTGCGCTTTCCTTTCTGTC	TCTCCGCAGTTTCCTCAAAT
XIAP	CGGATCTTTACTTTTGGGACA	TTGCACCCTGGATACCATT

* fwd - forward; rev - reverse

2.1.10 siRNA

Für die siRNA-Experimente wurde kommerziell erhältliche siRNA der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 2.10: siRNA der Firma Qiagen

<i>siRNA</i>	<i>Target-Sequence</i>	<i>Katalog Nr.</i>
B7H3	CTGAAACACTCTGACAGCAAA	SI02779007
BIRC5_5 (Survivin)	AAGCATTCGTCCGGTTGCGCT	SI00299453
BIRC5_7 (Survivin)	CTCGGCTGTTCTGAGAAATA	SI02652937
AllStars negativ Kontroll-siRNA (<i>scrambled</i>)	firmenseitig keine Angabe	SI1027280
AllStars negativ Kontroll-siRNA (AlexaFluor 488)	firmenseitig keine Angabe	SI1027284

2.1.11 Molekulargewichtsmarker

Als Molekulargewichtsmarker zur halbquantitativen Größenbestimmung von DNA-Fragmenten diente der „1 kb *Ladder*“ der Firma Fermentas (St. Leon-Roth, Deutschland).

Zur Proteingrößenbestimmung wurde der PageRulerTM Plus *Prestained Protein Ladder* der Firma Fermentas (St. Leon-Roth, Deutschland) eingesetzt.

2.1.12 Sonstige Reagenzien

Tabelle 2.11: Sonstige Reagenzien

<i>Reagenz</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Protease-Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
Proteinase K	Roche, Basel, Schweiz
Desoxyribonukleotide (dNTP)	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
DNaseI	Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
RNase A	Qiagen, Hilden, Deutschland
SYBR Green	Applied Biosystems; Foster City, CA, USA
SYBR Green	Takara Bio Inc.; Otsu, Japan
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol [®]	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Celecoxib	BioVision, Mountain View, CA, USA
p-Nitrophenylphosphat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ampicillin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kanamycin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Valproinsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
5-Aza-2'-deoxycytidin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Super Signal West Dura Chemiluminescent Substrat	Thermo Scientific; Waltham, MA, USA
ECL Plus Substrat	GE Healthcare, Little Chalfont, UK

Das in der Arbeit verwendete SMAC *Mimetic* wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Martin Leverkus (Universitätsmedizin, Mannheim, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Bakterien

2.2.1.1 Nährmedien für *E. coli*

LB-Medium: 25 g LB Broth
 1 l ddH₂O
 pH Wert auf 7,2 einstellen

LB-Medium + Agar: LB Medium + 2% Agar

SOC-Medium: 2 % Bacto Trypton
 0,5 % Hefe-Extrakt
 2,5 mM Kaliumchlorid
 10 mM Magnesiumchlorid-Hexahydrat
 10 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat
 10 mM Natriumchlorid

Zur Selektion wird dem Medium Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml oder Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt. Als Stocklösung werden 100 mg/ml Ampicillin in 50%-igem Ethanol gelöst, zu je 250 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.1.2 Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht der Bakterien erfolgt in LB-Medium. Flüssigkulturen werden mit einer Frequenz von 200-250 rpm im Rotationsschüttler bei 37 °C bis zur gewünschten Zelldichte kultiviert; Agarplatten bei 37 °C für 12-16 h.

2.2.1.3 Kryokulturen von *E. coli*

Zur Langzeitlagerung von Bakterien werden diese in einem 50%-igem Glycerin/Wasser Gemisch resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 DNA Amplifikation durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wird die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verwendet. Die eingesetzte Enzymmenge richtet sich nach den Herstellerangaben. Nachfolgender Reaktionsansatz entspricht den verwendeten Mengen und Konzentrationen der einzelnen Komponenten bei Standardbedingungen:

Polymerase-Puffer (10x)	2,5 µl
dNTPs (Desoxyribonukleotide, 10 mM)	2 µl
Primer (10 pmol/µl)	je 1,5 µl
Polymerase	x µl
DNA (~ 10-100 ng)	y µl
ddH ₂ O	ad 25 µl

Standard-PCRs zur Überprüfung von DNA-Abschnitten wurde unter Verwendung einer Taq-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland) durchgeführt. Bei der Klonierung des scFv35-Fragments wurde auf eine Pfu-Polymerase mit „*Proof Reading*“-Funktion (Roche, Basel, Schweiz) zurückgegriffen.

Die Standard-Bedingungen für eine PCR-Reaktion sind im Folgenden aufgeführt:

95 °C	10 min	
95 °C	30 sek	} 35 x
55 – 60 °C*	30 sek	
72 °C**	1 min	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

* die Primer-Annealing-Temperatur richtet sich hauptsächlich nach der Basenkomposition des Primers

** die Elongationszeit und –temperatur richten sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes und der verwendeten Polymerase

Eine Anwendungsmöglichkeit der PCR stellt die Kolonie-PCR dar, die dem direkten Nachweis eines beliebigen DNA-Fragmentes in Mikroorganismen dient. Dazu wird ein einziger Bakterienklon in einen Reaktionsansatz überführt und anschließend einer PCR-Reaktion ausgesetzt, sodass die zeitaufwendige Aufreinigung von Plasmid-DNA entfallen kann.

2.2.2.2 Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Die Protokolle zum Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA (dsDNA) richten sich nach den Herstellerangaben. Ein standardisierter Restriktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Restriktionspuffer (10 x)	2 µl
BSA (bovines Serumalbumin; 20 mg/ml)	1 µl*
DNA	5 µg
Restriktionsenzym	x µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

* die Verwendung von BSA ist optional

2.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung von Agarosegelen werden, je nach erwarteten Fragmentgrößen, 0,7% bis 1,5% Agarose in 0,5% TBE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Ethidiumbromid in einer Konzentration von 1 µg/ml dient zur Detektion der DNA-Fragmente und wird vor dem gießen des Gels zur warmen Agaroselösung gegeben und durch schütteln gemischt. Das flüssige Gel wird in eine Gelkammer verfüllt und die Probenaschen mithilfe von Kämmen ausgespart. Nach dem Erstarren des Gels wird dieses in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Station gelegt und mit Puffer bedeckt. Die zu analysierenden DNA-Proben werden mit 20% Gel-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels geladen; zur Größenanalyse wird ein DNA-Marker mitgeführt. Die Trennung der Proben erfolgt bei einer Spannung von 120-130 V.

5 x TBE-Puffer:	54	g	Tris-Base
	27,5	g	Borsäure
	40	ml	EDTA (0,5 M; pH 8,0)
ad	1	l	H ₂ O

Gel-Ladepuffer:	2,5	mg	Bromphenolblau
	2,5	mg	Xylencyanol
	300	µl	Glycerol
ad	1	l	ddH ₂ O

2.2.2.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von im Agarosegel aufgetrennter DNA werden die Fragmente unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und in ein zu $\frac{2}{3}$ mit silanisierter Glaswolle gefülltes 0,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben, das am unteren Ende durchstoßen ist. Das Reaktionsgefäß wird in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gestellt und für 10 min bei 8000 g und RT zentrifugiert. Das 0,5 ml-Reaktionsgefäß wird verworfen. Das Volumen der im 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorhandenen Lösung wird bestimmt und die darin enthaltene DNA unter Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 4,8) und der 2,5-fachen Menge reinem Ethanol gefällt. Die DNA wird bei 20000 g für 20 min und 4 °C pelletiert und das Sediment in einem geeigneten Volumen ddH₂O aufgenommen.

2.2.2.5 Ligation

Die Ligation eines DNA-Fragmentes (*Insert*) in einen Vektor wird laut Herstellerangaben durchgeführt. Idealerweise werden „*Insert*“ und Vektor in einem Molekülverhältnis von 1:5 eingesetzt. Ein Ligationsansatz setzt sich dabei wie folgt zusammen:

T4 DNA-Ligase-Puffer (10x)	1 µl
T4 Ligase (100 U/ml)	1 µl
DNA-Fragment	x µl
Vektor-DNA	y µl
ddH ₂ O	ad 10µl

Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgt über Nacht, indem das Reaktionsgefäß am Rand einer mit Eis gefüllten Box befestigt wird, sodass durch das allmähliche Schmelzen des Eises ein Temperaturgradient über einige Stunden erzeugt wird.

2.2.2.6 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien beruht auf der Verwendung von CaCl_2 und orientiert sich an der Beschreibung von Hanahan²²⁸.

Dazu wird eine Vorkultur, bestehend aus 3 ml LB-Medium mit 10 mM MgSO_4 versetzt und mit 10 μl einer Glycerolkultur chemisch kompetenter Bakterien beimpft. Nach einer Inkubationszeit von 12-16 h bei 37 °C und 250 rpm werden 500 μl der Vorkultur zur Inokulation von 50 ml LB-Medium mit 10 mM MgSO_4 verwendet. Die Kultivierung der Bakterien erfolgt bis zu einer OD_{600} von 0,3-0,5. Die Zellen werden bei 4000 g und 4 °C für 5 min geerntet und in 14 ml Transferpuffer I resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation auf Eis werden die Zellen unter den oben genannten Bedingungen erneut zentrifugiert und das Sediment vorsichtig in 2 ml Transferpuffer II aufgenommen. Die Zellsuspension wird zu je 100 μl Aliquotes in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C gelagert.

Transferpuffer I:

3	ml	Kaliumacetat (1 M)
10	ml	Kaliumchlorid (1 M)
1	ml	Calciumchlorid (1 M)
10	ml	Glycerol

Ad 80 ml mit ddH_2O auffüllen, mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,1 einstellen und autoklavieren.
Anschließend Zugabe von

5	ml	Magnesiumchlorid (1 M)
---	----	------------------------

und auffüllen der Lösung auf 100 ml ddH_2O

Transferpuffer II:

1	ml	MOPS (3-N-Morpholinopropansulfonat, 0,2 M)
0,2	ml	Kaliumchlorid (1 M)
1,5	ml	Calciumchlorid (1 M)
2,4	ml	Glycerol
ad	20	ml ddH_2O

2.2.2.7 Bakterientransformation

Zur Transformation chemisch kompetenter Bakterien werden diese auf Eis aufgetaut und mit der zur transformierenden DNA (Plasmide 1 ng; Ligationsansätze 1-5 µl) für 10-30 min inkubiert. Im Anschluss erfolgt ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 sek. Die unmittelbare Lagerung (2 min) auf Eis erhöht die Transformationseffizienz. Die Bakteriensuspension wird mit 400 µl vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und bei 37 °C für eine Stunde in einem Thermoschüttler geschüttelt. Zur Selektion der gewünschten Bakterienklone werden LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsmedium versehen und für 12-16 h bei 37 °C inkubiert.

Die Kompetenz von Bakterien kann über folgende Formel bestimmt werden:

$$\frac{\text{Anzahl der Kolonien}}{\text{DNA-Menge (pg)}} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} \times \frac{\text{Gesamtvolumen } (\mu\text{l})}{\text{Volumen ausplattiert } (\mu\text{l})} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien}}{\mu\text{g Plasmid DNA}}$$

2.2.2.8 Plasmidisolierung aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmiden aus Bakterien erfolgt über die Alkalische Lyse nach einer Methode von Birnboim und Doly²²⁹. Aufreinigungen im Maßstab von 100 ml werden unter Verwendung des EndoFree Plasmid-Maxi-Kit der Firma Qiagen laut Herstellerangaben durchgeführt.

Zur Klonierungskontrolle genügen kleinere Aufreinigungen im Maßstab von 5 ml. Dazu wird pro Klon eine Flüssigkultur mit dem entsprechenden Selektionsmedium über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die Bakterien werden am Folgetag bei 12000 g für 2 min abzentrifugiert und in 100 µl GTE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µl NaOH/SDS folgt eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Der Suspension werden 100 µl Kaliumacetat (pH 4,8) zugefügt und diese erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Proteine und Zellmembranen ebenso wie genomische DNA werden bei 13000 g für 3 min bei RT pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wird mit 800 µl 95%-igem Ethanol gefällt, für 2 min bei RT inkubiert und bei 12000 für 1 min abzentrifugiert. Die pelletierte DNA wird anschließend für 5 min bei RT getrocknet und in 20 µl H₂O gelöst.

GTE-Puffer:	50	mM	Glukose
	25	mM	Tris-HCl
	10	mM	EDTA

Die Sequenzierreaktion zur Amplifikation des „*Template*“-Stranges wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

96 °C	1 min	
96 °C	30 sek	} 90 x
50 °C	15 sek	
60 °C	4 min	
4 °C	∞	

Der Reaktionsansatz wird anschließend mit 90 µl H₂O versetzt und unter Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M; pH 4,8) und der 2,5-fachen Menge reinem Ethanol bei 16000 g für 15 min und RT gefällt. Nach einem Waschschrift mit 70%-igem Ethanol wird die pelletierte DNA getrocknet und in 15 µl HiDi (*highly deionized*)-Formamid aufgenommen. Die Sequenzanalyse erfolgt mit einem ABI 3130 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

2.2.3 Kultivierung von Säugerzellen

2.2.3.1 Allgemeine Prinzipien

Die im Verlauf der Arbeit verwendeten Zelllinien werden bei 37 °C und 5% CO₂ bis zu einer Konfluenz von ca. 90% kultiviert. Bei adhärennten Zelllinien erfolgt mit Erreichen der Konfluenz die der jeweiligen Zelllinie angemessene Passagierung (i.d.R. 1:4 bis 1:10). Dazu wird das Medium abgenommen, die Zellen werden mit PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin enzymatisch von der Oberfläche gelöst. Die Reaktion wird durch die Zugabe von FBS-haltigem Medium gestoppt.

Die verwendeten Suspensionskulturzellen werden zur Passagierung in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 1000 g für 5 min abzentrifugiert. Das verbrauchte Medium wird abgenommen, die Zellen in frischem Medium verdünnt und entsprechend weiter kultiviert.

PBS-Puffer (10x):	80	g	Natriumchlorid
	2	g	Kaliumchlorid
	14,2	g	Dinatriumhydrogenphosphat – Dihydrat
	2,04	g	Kaliumdihydrogenphosphat
	ad	1	1
			ddH ₂ O

2.2.3.2 Zellen einfrieren

Zum Einfrieren von Zellen werden lediglich solche Kulturen verwendet, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Adhärenente Zellen werden trypsinisiert in frisches Medium aufgenommen, gezählt und auf eine Zelldichte von 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Suspensionskulturzellen werden gezählt, abzentrifugiert und mit frischem Medium auf oben genannte Zelldichte eingestellt. Als Einfriermedium dient ein Gemisch aus 30% Kulturmedium, 50% FBS und 20% DMSO, welches 1:2 mit der Zellsuspension vermischt und in 2 ml-Kryoröhrchen aliquotiert wird. Die Zellen werden in einer Einfrierbox für max. 24 h bei -80 °C eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgt in einem Stickstofftank bei -150 °C.

2.2.3.3 Isolierung von humanen peripheren Blutlymphozyten (PBLs)

Die zur Erzeugung chimärer T-Zellen nötigen Lymphozyten werden aus dem Blut gesunder Spender bzw. aus „*Buffy Coats*“ (der hiesigen Blutbank) isoliert. Die entsprechenden Genehmigungen der zuständigen Ethikkommission liegen ebenso vor, wie eine unterschriebene Einverständniserklärung der Patienten bzw. der jeweiligen Erziehungsberechtigten.

Zur Isolierung der Lymphozyten werden 50 ml heparinisiertes Vollblut 1:2 mit PBS verdünnt. In einem 50 ml-Reaktionsgefäß werden 20 ml einer Polysucrose-Lösung (BIOCOLL, 1,077 g/ml; Biochrom AG) vorgelegt und mit 30 ml des verdünnten Vollbluts überschichtet. Zur Ausbildung des Dichtegradienten wird das Blut für 30 min bei RT und 1800 g ohne Bremse zentrifugiert. Das Serum im oberen Abschnitt des Gradienten wird verworfen und die als weißlicher Ring sichtbaren Lymphozyten unmittelbar über der Sucrose-Lösung werden mithilfe einer Pasteurpipette in ein 15 ml Falconröhrchen überführt (Abbildung 2.1). Die restliche Sucrose-Lösung inklusive der Erythrozyten wird ebenfalls verworfen. Zur möglichst reinen Isolierung der Lymphozyten werden diese zweimal mit PBS gewaschen; der erste Waschschrift erfolgt bei 400 g für 20 min, der zweite Waschschrift bei 600 g für 10 min.

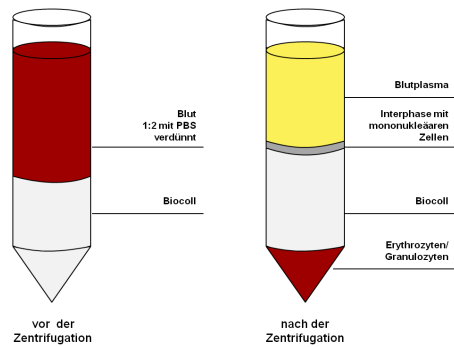


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Auftrennung lymphozytärer Zellen mittels BIOCOLL-Gradienten vor und nach dem Zentrifugationsschritt.

2.2.3.4 Kultivierung von humanen T-Zellen

Zur selektiven Vermehrung von T-Zellen werden die frisch isolierten Lymphozyten (siehe Abschnitt 2.2.3.3) mit 50 ng/ml anti-CD3 (OKT-3) und 1 µg/ml anti-CD28-Antikörpern stimuliert und in RPMI mit 10% FBS und 1% Pen/Strep kultiviert. Zur Aufrechterhaltung und Vermehrung der primären T-Lymphozyten erfolgt alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel unter Zugabe von 800 U/ml IL-2.

2.2.3.5 Kultivierung von humanen Zytokin-induzierten Killerzellen (CIKs)

Zur Expansion von Zytokin-induzierten Killerzellen (*cytokine induced killer cells*, CIK) werden die frisch isolierten Lymphozyten (siehe Abschnitt 2.2.3.3) in RPMI mit 10% FBS unter Zugabe von 1000 U/ml IFN γ an Tag 0 und 50 ng/ml anti-CD3 (OKT-3), 100 U/ml IL-1 α sowie 400 U/ml IL-2 an Tag 1 kultiviert²³¹. Im Folgenden wird alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel unter Zugabe von 400 U/ml IL-2 durchgeführt.

2.2.4 Transfektion von Säugerzelllinien

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in Säugerzelllinien. Es wird unterschieden zwischen einer zeitlich begrenzten (transienten) Transfektion und einer stabilen Transfektion, bei der die Fremd-DNA in das Wirtsgenom integriert wird.

2.2.4.1 Calciumphosphatpräzipitation²³²⁻²³⁴

Am Tag vor der Transfektion wird die zu transfizierende Zelllinie ausgesät, sodass sich die Zellen am Folgetag in der exponentiellen Wachstumsphase befinden und zu 50-70% konfluent sind. Am nächsten Tag wird das Medium 30 min bis 2 h vor der Transfektion durch

Chloroquin (25 μM) versetztes Medium ersetzt. Chloroquin bewirkt eine Inhibierung der lysosomalen DNase-Aktivität und erhöht damit die Effektivität der Transfektion. Die Menge der eingesetzten DNA ist abhängig von der Größe des verwendeten Zellkulturgefäßes und in Tabelle 2.12 aufgelistet.

Tabelle 2.12: Angaben der für die CaPO_4 Transfektion benötigten DNA - und Lösungsmittelmengen

<i>Format</i>	<i>Kulturmedium (ml)</i>	<i>1x HEBS (μl)</i>	<i>2,5 M CaCl_2 (μl)</i>	<i>DNA (μg)</i>
12-well	1	36	2,1	2,1
6-well	2	86	5,1	5,1
10 cm	8	500	30	30

DNA und CaCl_2 werden vermischt und tropfenweise unter permanenter Lufteinleitung zu der entsprechenden Menge 1x HEBS gegeben. Infolge der eingeleiteten Luft wird eine Vergrößerung der Flüssigkeitsoberfläche erreicht, woraus eine feinere Verteilung des CaPO_4 -Präzipitates resultiert. Zur vollständigen Ausbildung des Präzipitates wird das Gemisch für 20-30 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 4-6 Stunden (bei Calcium-toleranten Zelllinien auch über Nacht) wird das CaPO_4 -enthaltende Medium durch frisches Medium ersetzt. Bei einer transienten Expression ist das Expressionsmaximum nach 48 bis 72 h zu erwarten.

1x HEBS:	5 g	HEPES
	8 g	Natriumchlorid
	1 g	Dextrose
	0,37 g	Kaliumchlorid
	0,188 g	Dinatriumhydrogenphosphat
ad	500 ml	ddH ₂ O
	pH Wert exakt auf 7,2 einstellen	
2,5 M CaCl_2	27,75 g	wasserfreies Calciumchlorid
	oder 36,75 g	Calciumchlorid Dihydrat
ad	100 ml	ddH ₂ O

2.2.4.2 Chemische Transfektionsmethoden

Zur Transfektion von Säugerzellen mit siRNA werden in der vorliegenden Arbeit chemische Transfektionsreagenzien (HiPerFect) verwendet. Die Transfektionen werden in 6-well Platten

laut Herstellerprotokoll (reversen Transfektionsprotokoll, Qiagen, Hilden Deutschland) durchgeführt. Dabei werden die Zellen trypsiniert, in frisches Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Zur Transfektion werden 2×10^5 Zellen/well in einer 6-well Platte in einem Endvolumen von 2,4 ml eingesetzt. Die siRNA wird, wie in Tabelle 2.13 aufgeführt, vorbereitet und für 10 min bei RT inkubiert.

Tabelle 2.13: Zusammensetzung eines siRNA Transfektionsansatzes

<i>Komponente</i>	<i>Volumen</i>
siRNA	2,4 µl
Medium (Ø FBS)	85,4 µl
HiPerFect	12 µl

Zur Transfektion werden 100 µl des siRNA-Mix zu den Zellen gegeben und durch Bewegungen der Platte ähnlich einer liegenden acht (∞) vermischt. Nach 6 Stunden wird das Transfektionsmedium durch frisches Medium ersetzt und die Zellen für 24, 48, 72 und 96 h inkubiert.

2.2.4.3 Elektroporation von Säugerzelllinien²³⁵⁻²³⁷

Zur Transfektion von RMS-Zelllinien mit Plasmid-DNA hat sich die Elektroporation als die geeignete Methode herausgestellt. Die Elektroporation der Zellen erfolgt mit dem NEONTM-Transfektions-System der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Die zur Transfektion verwendeten Zellen sollten sich zum Zeitpunkt der Transfektion in der exponentiellen Wachstumsphase befinden und eine Konfluenz von 70-90% aufweisen. Tabelle 2.14 stellt die verwendeten Zellzahlen und die eingesetzte DNA in Abhängigkeit von der Größe des Kulturgefäßes dar. Die Zellen werden gezählt, einmal in PBS gewaschen und in der entsprechenden Menge Puffer R aufgenommen.

Tabelle 2.14: Angaben der DNA- und Lösungsmittelmengen zur Transfektion von Säugerzellen mittels Elektroporation

<i>Format</i>	<i>Kulturmedium (ml)</i>	<i>Resuspensions- puffer (µl)</i>	<i>Zelldichte (Zellen/well)</i>	<i>DNA (µg)</i>
12-well	1	20	$2 - 4 \times 10^5$	1,5
6-well	2	40	$0,5 - 1 \times 10^5$	3

Zur Elektroporation werden die Zellen mit der zu transfizierenden DNA vermischt und mittels einer speziellen Elektroporationspipette, die gleichzeitig die Elektrode beinhaltet, in ein mit 3 ml elektrolytischen Puffer E gefülltes Elektroporationsgefäß eingesetzt. Die Elektroporation von RMS-Zellen erfolgt bei einer Spannung von 1000 V mit einer Impulsdauer von 30 ms und einer Gesamtanzahl von zwei Impulsen.

2.2.5 Transduktion von Säugerzellen

Bei der Transduktion von humanen Zellen und Zelllinien werden Retroviren verwendet, wodurch die entsprechenden Arbeiten in einem S2-Labor durchzuführen sind.

Zur Produktion der Viren dienen die leicht zu transfizierenden 293T-HEK-Zellen (Verpackungszelllinie), die zusätzlich ein „*large T-Antigen*“ exprimieren. Am Tag vor der Transduktion wird die Verpackungszelllinie mittels Calciumphosphatpräzipitation mit dem gewünschten retroviralen Vektorkonstrukt und den beiden Verpackungsplasmiden pHIT60 und pCOLT-GALV kotransfiziert. pHIT trägt die Information für die retroviralen internen Strukturproteine (gag), die reverse Transkriptase und Integrase (pol), während pCOLT für die viralen Hüllproteine (env) codiert. Die verwendeten Vektoren tragen zusätzlich einen SV40-ORI (*origin of replication*), der in Kombination mit dem „*large T-Antigen*“ der 293T-Zellen eine Amplifikation der Vektoren in Säugerzellen bewirkt und die Virusproduktion steigert²³⁸.

Durch die Phi-Sequenz des retroviralen Vektorkonstrukts (Abbildung 6.1) wird die replizierte RNA (als virales Genom) verpackt und in den Überstand sezerniert. Da die Verpackungsplasmide aufgrund fehlender Phi-Sequenzen nicht mit verpackt werden, ist eine Vermehrung der Viruspartikel in den Zielzellen nicht mehr möglich und die Virusproduktion bleibt auf die 293T-Zellen begrenzt.

Nach 6-12 h werden die Zellen einmal mit frischem Medium gewaschen und in dem Medium, welches für die Zielzellen verwendet wird, weiter kultiviert. Der Virusüberstand kann 24 h und 48 h nach Transfektion mit den Virusplasmiden abgenommen werden.

2.2.5.1 Transduktion von humanen peripheren Blutlymphozyten (PBL)

Humane Blutlymphozyten werden möglichst 48 h nach Stimulation (Abschnitte 2.2.3.3 und 2.2.3.4) zur Transduktion verwendet. Die PBLs werden dazu in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/well (6-well Platte) für 24-48 h mit den virusproduzierenden 293T-Zellen kokultiviert. Anschließend werden die Suspensionszellen von der 293T-Zellschicht abgespült und in

Suspensionskulturflaschen weiter kultiviert. Eine Expressionsanalyse sollte frühestens 48 h nach der Transduktion erfolgen, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.

2.2.5.2 Transduktion von adhärenenten Zellen

Werden dagegen adhärenente Zellen transduziert, wird der Virusüberstand von der Verpackungszelllinie durch einen 0,4 µm Filter von abgelösten virusproduzierenden Zellen gereinigt und auf die entsprechenden Zielzellen gegeben. Zur Verbesserung der Transduktionseffizienz werden 5 µg/ml Polybren (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) zugesetzt. Die Zellen werden über 24 h mit dem Virusüberstand inkubiert und der Vorgang am Folgetag wiederholt. Ähnlich wie bei den PBLs sollte eine Expressionsanalyse frühestens 48 h nach der Transduktion erfolgen.

2.2.6 Zytotoxizitätstest

Zum Nachweis spezifischer Zelltoxizität kommt ein Thiazolium-Salz zum Einsatz. Der MTT-Test (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) dient der Detektion lebender Zellen über deren Reduktion des gelblichen Thiazolium-Salzes (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; MTT) zu einem violetten wasserunlöslichen Formazan durch die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH.

2.2.6.1 Kokultivierung von chimären T-Zellen mit Tumorzellen

RMS- und Kontrollzellen werden in 96-well Rundbodenplatten in einer Konzentration von 1×10^4 Zellen/well ausgesät (Endvolumen pro well 100 µl) und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgt die Verteilung der Effektorzellen in verschiedenen Effektor:Targetzellverhältnissen. Dazu werden die rezeptortragenden und nicht modifizierte T-Zellen gezählt und eine Verdünnungsreihe ausgehend von 5×10^4 Zellen/well hergestellt. Zur Kokultivierung werden die Lymphozyten in der jeweiligen Verdünnung vorsichtig auf die Tumorzellen pipettiert, um diese nicht abzuschwemmen. Als Negativkontrolle dienen die jeweiligen Tumorzellen ohne Effektorzellen bzw. die Effektorzellen in den zur Kokultivierung korrespondierenden Zelldichten. Jede Kombination wird als Triplikat angesetzt. Abbildung 2.2 zeigt exemplarisch einen im Verlauf der Arbeit verwendeten Aufbau eines Zytotoxizitätstests mit chimären T-Zellen. Nach 48 h werden 150 µl Überstand abgenommen und für weitere Analysen bei -20 °C aufbewahrt. Für den MTT Test wird den Zellen 50 µl frisches Medium zugegeben, mit 20 µl MTT (5 mg/ml) versetzt und 4 h bei 37

°C inkubiert. Der wässrige Überstand wird im Anschluss abgenommen und die Formazan-Kristalle in 200 µl DMSO gelöst. Die Reduktion des MTT durch vitale Zellen wird kolorimetrisch bei 560 nm und einer Referenzwellenlänge von 670 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmt.

Die Viabilität der Zellen wird über die Mittelwerte von Tumor- und Effektorzellen nach Kokultivierung, ebenso wie über die Mittelwerte von Tumorzellen bzw. Effektorzellen alleine bestimmt. Der Hintergrund berechnet sich aus dem Mittelwert dreier mit Medium gefüllter *wells*.

$$\text{Viabilität} = \frac{(\text{OD (Cocultivering Effektor : Target-Zellen - korrespondierende Anzahl der Effektorzellen)})}{(\text{OD (Tumorzellen - Medium)})}$$

Das Überleben von Tumorzellen nach Kokultivierung mit nicht rezeptortragenden T-Zellen (MOCK) entspricht 100% (Zytotoxizität nicht rezeptortragender T-Zellen: 0%).

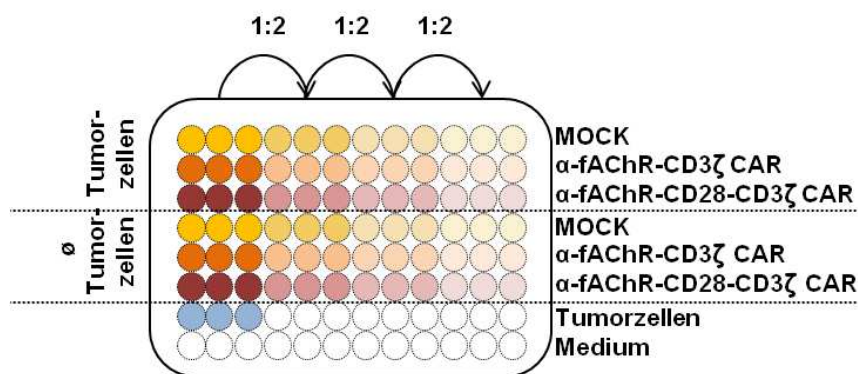


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau eines Zytotoxizitätstestes von chimären T-Zellen und Tumorzellen

2.2.6.2 Testung toxischer Substanzen

Die Testung toxischer Substanzen verläuft unter ähnlichen Bedingungen wie im Abschnitt 2.2.6.1 beschrieben. In 96-well Platten wird eine festgelegte Zellzahl (1×10^4 Zellen/ml) ausgesät und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Das Medium wird entfernt, die Zellen einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und mit 1% FBS-haltigem Medium über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag erfolgt die Zugabe der zu testenden Substanz in der gewünschten Konzentration oder einer Verdünnungsreihe. Als Negativkontrolle dienen nicht behandelte Zellen. Die Bestimmung des Hintergrundes erfolgt durch eine Mediumkontrolle. Tabelle 2.15 gibt einen Überblick über die Konzentrationen der getesteten Substanzen.

Tabelle 2.15: Substanzkonzentrationen

<i>Substanz</i>	<i>Konzentration (ng/ml)</i>
IFN γ	100
TNF α	10-50
TRAIL	0,1-10
FAS-L	0,1-50

2.2.7 ELISA (*enzyme linked immunosorbant assay*)

Die Stimulation der PBLs nach Kokultivierung mit den Tumorzellen wird über die Sezernierung von IFN γ und Granzym B bestimmt. Beide Nachweise erfolgen immunologisch auf Grundlage eines ELISA der Firma Mabtech und werden laut Herstellerangaben durchgeführt. Als Detektionsreagenz dient in ELISA-Entwickler gelöstes pNitro-Phenyl-Phosphat (1mg/ml). Die Auswertung des ELISAs erfolgt bei einer OD von 405 nm mit einem Mikrotiterplatten Lesegerät.

ELISA-Entwickler: 0,5 mM Magnesiumchlorid
 10 % Diethanolamin
 pH 9,8

2.2.8 Durchflusszytometrische Analysen

Die Bestimmung der Konzentration Zelltyp-spezifischer Oberflächenproteine und die Quantifizierung apoptotischer Zellen erfolgen unter Verwendung eines Durchflusszytometers der Firma Becton Dickinson.

2.2.8.1 Färbungen von Oberflächenmolekülen

Pro Färbung werden 1×10^5 Zellen eingesetzt. Die Färbung der Zellen erfolgt in einer 96-well Platte. Um Kreuzreaktionen mit Medium- oder FBS-Rückständen zu verhindern, werden die Zellen vor der Färbung zweimal in PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgt für eine Stunde auf Eis. Die Zellen werden zur Entfernung nicht gebundenen Primärantikörpers dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min mit Farbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper, ebenfalls auf Eis, inkubiert. Vor der Analyse wird nicht gebundener Sekundärantikörper durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen in 200 μ l PBS aufgenommen.

Bei der Verwendung von direkt gekoppelten Antikörpern entspricht die Inkubationsdauer derjenigen des Sekundärantikörpers.

2.2.8.2 Annexin V/Propidiumiodid-Färbung⁸⁶

Zur Unterscheidung apoptotischer und nekrotischer Zellen werden 2×10^5 Zellen zweimal in kaltem PBS gewaschen und anschließend in 50 μ l kaltem Annexin V-Bindepuffer aufgenommen (BioLegend, San Diego, CA, USA). Nach Zugabe von 5 μ l Fluorescein-gekoppeltem Annexin V (BioLegend) und 10 μ l Propidiumiodid (1 mg/ml; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) werden die Zellen für 15 min bei RT inkubiert und anschließend mit weiteren 200 μ l Annexin V-Bindepuffer versetzt. Die durchflusszytometrische Analyse sollte innerhalb einer halben Stunde erfolgen.

2.2.9 Proteinbiochemische Methoden

Um Proteindegradation zu vermeiden, werden Proteinlösungen möglichst auf Eis aufgetaut und weiterverarbeitet.

2.2.9.1 Proteinextraktion aus Säugerzellen

Zur Proteinextraktion werden Säugerzellen in 6-well Platten ausgesät und für die Dauer der Behandlung oder bis zu einer Konfluenz von ~90% inkubiert. Die Zellen werden trypsinisiert, in frisches Medium aufgenommen und anschließend bei 1000 g für 5 min geerntet. Zur Entfernung aller FBS-Reste werden die Zellen dreimal in PBS gewaschen und anschließend in 200 μ l DISC-Lysepuffer resuspendiert. Die Zelllyse erfolgt über einen Zeitraum von 30 min auf Eis. Membranen und genomische DNA werden bei 16000 g für 20 min pelletiert und der proteinhaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der Proteine erfolgt bei -80 °C.

DISC-Lysepuffer	30	mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	120	mM	Natriumchlorid
	10	%	Glycerol
	1	%	Triton X-100

Der DISC-Lysepuffer wird bei 4 °C gelagert. Protease- und Phosphataseinhibitor werden kurz vor Verwendung des Lysepuffers laut den Herstellerangaben frisch zugegeben.

2.2.9.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

In vorliegender Arbeit wird eine Färbung nach Bradford²³⁹ zur Abschätzung der Proteinkonzentration einer Lösung eingesetzt. Als Farbstoff dient der Coomassie Plus (Bradford) Protein-Assay der Firma Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). Der Assay wird laut Herstellerangaben durchgeführt und die Proteinkonzentration mit einem Spektrometer bei 560 nm bestimmt.

2.2.9.3 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgt nach der Größe über eine diskontinuierliche SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Methode nach Laemmli²⁴⁰ verwendet zwei Tris-Glycin-Puffersysteme bestehend aus einem weitmaschigen Sammelgel (pH 6,8), welches der Vortrennung und Aufkonzentrierung der Proteine dient, während die eigentliche Trennung in einem engporigeren Trenngel (pH 8,8) vonstattengeht. Je nach Größe des zu analysierenden Proteins werden 10- bis 15%-ige Trenngele verwendet. Tabelle 2.16 listet die Pufferkomponenten für verschiedene Konzentrationen des Trenngels auf. Das angegebene Volumen ist ausreichend für zwei Mini-Gele.

Tabelle 2.16: Pufferzusammensetzung bei verschiedenen konzentrierten Trenngelen

<i>Pufferkomponente</i>	<i>8% (50-200 kDa)</i>	<i>10% (30-120 kDa)</i>	<i>12% (15-100 kDa)</i>	<i>15% (10-60 kDa)</i>
Acrylamid (30%)	2,7 ml	3,3 ml	4 ml	5 ml
Tris pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
H ₂ O	4,6 ml	4 ml	3,3 ml	2,3 ml
SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl

Die Zusammensetzung des Sammelgels ist in Tabelle 2.17 beschrieben.

Tabelle 2.17: Zusammensetzung des Sammelgels

<i>Pufferkomponente</i>	<i>Volumen</i>
Acrylamid	650 µl
Tris-Cl, pH 6,8	1,25 ml
H ₂ O	3 ml
SDS	50 µl
APS	50 µl
TEMED	10 µl

Pro Analyse werden 20-30 µg Protein eingesetzt, mit 20% Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min gekocht. Die Gelelektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 80-100 V.

Laemmli-Probenpuffer:

- 125 mM Tris
- 20 % Glycerin
- 4 % Natriumdodecylsulfat
- 10 % β-Mercaptoethanol
- 0,004 % Bromphenolblau

Elektrophorese Puffer (10x):

- 250 mM Tris
- 1,92 M Glycin
- 1 % Natriumdodecylsulfat

2.2.9.4 Western Blotting und immunologischer Proteinnachweis

Zur immunologischen Detektion von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen werden diese aus dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran unter Einfluss eines elektrischen Feldes übertragen. Die PVDF-Membran wird zunächst für 30 sek in Methanol äquilibriert und anschließend für 2 min in destilliertem Wasser gespült. Alle Komponenten des Tank-Blots, inklusive des Polyacrylamid-Gels und der Membran, werden vor dem zusammensetzen für 5-10 min in Transferpuffer inkubiert. Die Komponenten des Blots werden in einer aufklappbaren Gitterkassette von der Kathode zur Anode hin folgendermaßen angeordnet:

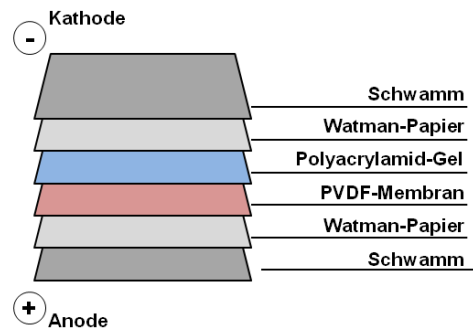


Abbildung 2.3: Aufbau einer Western Blot Apparatur.

Der Proteintransfer vom Polyacrylamid-Gel zur PVDF-Membran erfolgt bei einer Stromstärke von 60 mA pro Mini-Gel für drei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C.

Transferpuffer:	150	mM	Glycin
	20	mM	Tris
	20	%	Methanol

Die Zielproteine auf der PVDF-Membran können im Folgenden immunologisch detektiert werden. Zur Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindestellen wird die Membran nach dem Blotten für 30 min in 5% Magermilchpulver oder alternativ in 3% BSA geschwenkt. Der Primärantikörper wird in einer 1 %-igen Magermilchlösung, ersatzweise in einer 0,5%-igen BSA-Lösung, laut Herstellerangaben verdünnt und für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C auf der Membran belassen. Nicht gebundener Antikörper wird durch drei Waschschrte mit TBS(T) für je 10 min von der Membran entfernt. HRP-gekoppelte Sekundärantikörper dienen zur Detektion des Zielproteins und werden für 1 h mit der Membran inkubiert. Die Verdünnung richtet sich nach den Herstellerangaben und erfolgt wiederum in 1%-iger Magermilch- bzw. 0,5%-iger BSA-Lösung. Überschüssiger Sekundärantikörper wird über drei Waschschrte mit TBS(T) für je 10 min entfernt und die Membran im Anschluss für 2 min in PBS geschwenkt.

TBS(T):	10	mM	Tris (pH 8,0)
	150	mM	Natriumchlorid
	(0,05 %		Tween20)

PBS-Puffer (10x):	80	g	Natriumchlorid
	2	g	Kaliumchlorid
	14,2	g	Dinatriumhydrogenphosphat – Dihydrat
	2,04	g	Kaliumdihydrogenphosphat
	ad	1	1
			ddH ₂ O

Die Visualisierung des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgt über die enzymatische Umsetzung eines als ECL (*enhanced chemiluminescent*) bezeichneten Detektionsreagenz durch die HRP und wird über ein Chemilumineszenz-*Imaging*-System detektiert. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgt mit der ImageJ-Software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

2.2.10 RNA Isolierung und Verarbeitung

Zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen während der einzelnen Arbeitsschritte werden Arbeitsmaterialien und Oberflächen vor Beginn der Arbeit mit RNase *away* (Roth, Karlsruhe, Deutschland) behandelt.

2.2.10.1 Isolierung von RNA aus Säugerzellen

Die Isolierung von RNA aus Säugerzellen wird unter Verwendung von TRIZOL[®] durchgeführt. Dazu werden die Zellen in 6-*well* Platten in einer Dichte von $2-4 \times 10^5$ Zellen pro *well* ausgesät und für die Dauer der Behandlung kultiviert. Die Zellen werden nach Abnahme des Mediums direkt in der Zellkulturplatte durch Zugabe von 1 ml TRIZOL[®] lysiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Aufarbeitung der RNA erfolgt entsprechend der Herstellerangaben. Die RNA wird in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen und die Konzentration der RNA spektrometrisch bestimmt.

2.2.10.2 DNase-Verdau

Um mögliche DNA-Kontaminationen zu eliminieren wird die RNA mit DNase behandelt. Pro Reaktion werden 2 µg RNA eingesetzt und der DNaseI-Verdau laut Herstellerangaben durchgeführt (Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland). Dem Verdau folgt eine spektrometrische Konzentrationbestimmung.

2.2.10.3 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese dient eine MMLV-Transkriptase. Die Synthese-Reaktion wird mit dem RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis-Kit der Firma Fermentas laut Herstellerangaben durchgeführt. Sofern genügend DNase-freie RNA vorhanden ist, wird pro Reaktion 1 µg RNA umgeschrieben. Als Primer werden die im Kit enthaltenen Oligo(dT)-Primer verwendet.

Für alle weiteren Analysen werden cDNA Verdünnungen von 1:10 bis 1:20 eingesetzt.

2.2.10.4 qRT-PCR Analysen

Die quantitative Bestimmung einer Genexpression beruht auf einer herkömmlichen PCR in deren Verlauf kontinuierlich die Menge an neugebildetem Produkt gemessen wird. Zur Detektion des Produktes werden Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, die entweder direkt an die Primer gekoppelt vorliegen (TaqManTM-Sonden) und im Verlauf der Reaktion freigesetzt werden oder DNA-interkalierende Agenzien, die sich in dsDNA einlagern und dadurch kontinuierlich die Produktneubildung nachweisen (SYBR Green).

Die qRT-PCR-Analysen werden mithilfe eines ABI-StepOne Plus Real Time PCR Gerätes (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) unter Verwendung des SYBRPremixExTaqII-Kit der Firma Takara (Otsu, Japan) laut den Herstellerangaben durchgeführt.

Das Reaktionsvolumen pro Reaktionsansatz beträgt 10 µl und jede Probe wird in Duplikaten analysiert.

Die Bedingungen für die PCR-Reaktion sind im Folgenden aufgeführt.

95 °C	10 min	} 40 x
95 °C	15 sek	
60 °C	1 min	

Die Qualität der Amplifikation wird direkt im Anschluss durch die Generierung einer Schmelzkurve (*melting curve*) bestimmt und so die Bildung von Nebenprodukten ausgeschlossen. Dabei wird das Dissoziationsverhalten der dsDNA während des Erhitzens detektiert. Dazu wird die Probe über einen Zeitraum von 40 min kontinuierlich um 0,3 °C erhitzt und durch die Freisetzung des SYBR Greens die Abnahme der Fluoreszenz bei der Temperatur bestimmt, bei der sich das PCR-Produkt trennt. Liegt mehr als ein PCR-Produkt vor, erhält man aufgrund der unterschiedlichen GC-Gehalte, verschiedene Schmelzkurven.

2.2.10.5 *Relative Quantifizierung*^{241 242}

Die gemessenen Proben werden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode quantifiziert und anhand nachfolgender Formel berechnet. Als Referenzgen dient GAPDH.

$2^{-\Delta\Delta C_T}$ Berechnung:

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Behandelt} - \Delta C_T \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

C_T (Schwellenwert-Zyklus - *Cycle Threshold*) bezeichnet dabei die Zykluszahl, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt.

Die Berechnung setzt die optimale Amplifikation des PCR-Produktes voraus. Bei Schwankungen in der Effizienz kann die Formel folgendermaßen korrigiert werden:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_T \text{ Zielgen (Kontrolle - Behandlung)}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta C_T \text{ Referenzgen (Kontrolle - Behandlung)}}$$

Zur statistischen Auswertung der qRT-PCR wird die REST-Software (relative expression software tool, www.qiagen.com/Products/REST2009Software) verwendet²⁴³.

2.2.11 Färbungen

2.2.11.1 *Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten*

Zur immunhistochemischen Färbung von in Paraffin eingebettetem Gewebe werden mit einem Schlittenmikrotom Schnittpräparate einer Dicke von 0,5 bis max. 1 μm angefertigt. Die Färbeprozedur wurde im histopathologischen Routinebetrieb mithilfe eines Färberoboters durchgeführt.

2.2.11.2 *Immunfluoreszenz Färbungen von Frischgewebe*

Zum Färben von Frischgewebe werden mithilfe eines Kryosaten Schnitte in einer Dicke von 5 bis max. 10 μm hergestellt und über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag werden die Schnitte zur Absättigung unspezifischer Bindestellen für 15 min in 3% BSA geblockt und mit 1x TBS gespült. Der Primärantikörper wird in Lösung aus 0,5% BSA in TBS verdünnt und für 1 h in einer feuchten Kammer mit dem Schnitt inkubiert. Zum Entfernen nicht gebundener

Antikörper wird der Schnitt dreimal für je 5 min in TBS gewaschen und für 1 h mit Sekundärantikörper in 0,5% BSA/TBS inkubiert. Es folgt dreimaliges Waschen mit 1x TBS. Die Schnitte werden anschließend mit *Vectashield Hard-Set Mounting Medium* (Vector Laboratories, Burlingham, CA, USA) eingedeckt. Zur Gegenfärbung der Kerne ist in dem Eindeckmedium zusätzlich DAPI enthalten. Die Schnitte werden zum Aushärten bei 4 °C über Nacht gelagert und am nächsten Tag fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

2.2.11.3 *Mikroskopie*

Mikroskopische Aufnahmen werden an einem Zeiss Axiophot2 (Oberkochen, Deutschland) und einem Olympus BX41 (Tokio, Japan) Mikroskop durchgeführt. Aufnahme und Bildanalyse erfolgen für das Axiophot2 mit der AxioCam MRc5 sowie der Software AxioVision Rel. 4.5, für das Olympus BX41 erfolgen die Aufnahmen mit einer Olympus U-CMAD3 Kamera, die Analysen mit der cellF-Software.

Für die Dokumentation von Zellen in der Zellkultur wird ein inverses Mikroskop (DMIRB) der Firma Leica (Wetzlar, Deutschland) verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Vorarbeiten

Grundlage der vorliegenden Arbeit war eine *Proof-of-Principle* Arbeit, in der gezeigt wurde, dass chimäre T-Zellen mit Spezifität für den fetalen Acetylcholinrezeptor (fAChR) grundsätzlich in der Lage sind – wenn auch mit geringer Effektivität – fAChR-exprimierende RMS-Zellen zu eliminieren²²³. Der ursprüngliche chimäre Rezeptor wurde aus einem rekombinanten Autoantikörperfragment kloniert, das mittels Phagen-Display-Technologie aus dem Thymusresektat einer schwangeren Frau isoliert worden war, die in ihrem Thymus praktisch ausschließlich Autoantikörper mit Spezifität für die γ -Untereinheit des fAChR produzierte²⁴⁴. Der Fetus dieser Frau war aufgrund der Autoantikörper von einer intrauterinen Muskellähmung mit dadurch bedingter, angeborener Gelenksteife (*Arthrogryposis multiplex congenita*) betroffen, während die Frau selbst nicht erkrankte²⁴⁵. Die variablen Domänen des rekombinanten Antikörperfragmentes wurden mithilfe einer PCR assembliert (Abbildung 3.1 (A) und (B)) und „in frame“ vor eine humane IgG1-„hinge“-Domäne und eine humane CD3 ζ -Domäne kloniert. Das chimäre Gen wurde anschließend in einen retroviralen SFG-Vektor umklontiert²²³. Der Vektor diente der Expression des chimären Antigenrezeptors (CAR) auf T-Zellen, die RMS-Zellen dadurch erkennen und lysieren konnten^{223 246}.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Aktivität des oben beschriebenen chimären Rezeptors zu steigern, Resistenzmechanismen von RMS-Zellen gegen chimäre T-Zellen aufzuklären und durch pharmakologische oder molekulare Überwindung der Resistenzen die Erkennung und Eliminierung von RMS-Zellen durch chimäre T-Zellen zu verbessern.

Die im Verlauf der Arbeit vorgenommenen *In-vitro*-Untersuchungen erfolgten anhand von sechs RMS-Zelllinien, welche die verschiedenen histologischen RMS-Subtypen repräsentieren (Tabelle 3.1) (Abbildung 6.2). Zum Zwecke der Zellzyklussynchronisation und Wirkstoffsteigerung wurden alle im Rahmen der Arbeit vorgenommenen Behandlungen mit Zytokinen oder Chemikalien in Hungermedium (1% FBS) durchgeführt.

Tabelle 3.1: Zusammenstellung der im Verlauf der Arbeit verwendeten RMS-Zelllinien anhand ihres histologischen Subtyps

<i>Histologischer Subtyp</i>	<i>Zelllinie</i>
ARMS (Pax3-FKHR)	CRL2061, RH30, RH41
ARMS (translokations-negativ)	FLOH1
ERMS	RD6, TE671

ARMS - alveoläre RMS; ERMS - embryonale RMS

Da Zelllinien durch die dauerhafte *In-vitro*-Kultivierung oftmals starke Unterschiede zur Expression *in situ* aufweisen, wurden die im Rahmen der Arbeit analysierten Moleküle ebenfalls anhand von Paraffin- und Frischmaterial (n = 10 bzw. n = 6) bei ARMS- und ERMS-Biopsien untersucht (Abbildung 6.2). Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit von Tumormaterial dienten verschiedene Methoden zur Detektion der betreffenden Proteine. Als Kontrollgruppe wurde quergestreifte Muskulatur sowohl in Form von Paraffin- als auch Frischgewebe (jeweils n = 5) verwendet.

3.2 Erzeugung verbesserter membranständiger CAR gegen den fAChR

Das „*single chain*“-Fragment gegen den fAChR, scFv35, wurde amplifiziert und mittels der beiden Restriktionsschnittstellen *RcaI* und *BamHI* in den retroviralen pBullet-Vektor umklontiert. Dabei wurde ein neues Konstrukt geschaffen, in dem das „*single chain*“-Fragment vor einer IgG-„*hinge*“-Region und einer intrazellulären Signaltransduktionsdomäne (CD3ζ) positioniert wurde (Rezeptor der ersten Generation). Als Modifikation gegenüber dem bereits publizierten „CD3ζ-*only*“-Konstrukt²²³ wurde zwischen IgG- und CD3ζ-Domäne eine zusätzliche CD28-Domäne eingeführt (Rezeptor der zweiten Generation) (Abbildung 3.1 (C)). CD28 dient als kostimulatorische Domäne, welche die Aktivierung ruhender T-Zellen bei fehlenden kostimulatorischen Signalen gewährleisten kann (Abschnitt 3.4.2). Die so generierten CAR (chimäre Antigenrezeptoren) wurden zunächst hinsichtlich ihrer Bindekapazität, Funktionalität und Spezifität gegenüber dem fAChR untersucht.

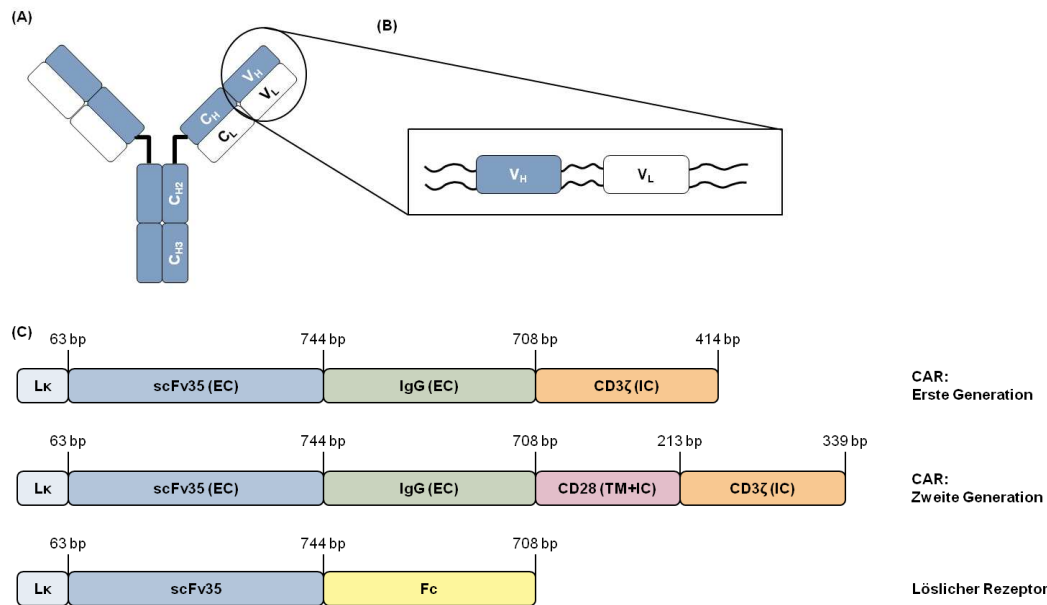


Abbildung 3.1: (A) Schematische Darstellung eines Antikörpers mit Unterteilung in variable und konstante Domänen aus dem durch die Verbindung von variabler „heavy chain“ (V_H) und variabler „light chain“ (V_L) das verwendete scFv35-Fragments generiert wurde (B). (C) Schematische Darstellung der Zusammensetzung aller in der Arbeit verwendeten chimären Antigenrezeptoren (CAR); V_H - variable Domäne der schweren Kette, V_L - variable Domäne der leichten Kette, C_H - konstante Domäne, schwere Kette, C_L - konstante Domäne, leichte Kette, EC – extrazelluläre Domäne, IC - intrazelluläre Domäne, TM - Transmembrandomäne, scFv - *single chain fragment*, Fc - *fragment crystallizable*.

3.2.1 Expression des Target-Antigens auf der Oberfläche von RMS-Zellen

Eine wichtige Grundlage für die chimäre T-Zelltherapie stellt die Expressionsstärke des Zielantigens dar²⁴⁷. Bei der durchflusszytometrischen Analyse der RMS-Zelllinien mit einem kommerziellen Antikörper wurden unterschiedliche Ausprägungen der fAChR-Expression beobachtet (Abbildung 3.2 (A)). Während die ARMS-Zelllinien RH41 und FLOH1 sowie die beiden ERMS-Zelllinien RD6 und TE671 eine starke Expression aufwiesen, war die Expression bei den beiden ARMS-Linien CRL2061 und RH30 vergleichsweise gering (Abbildung 3.2 (A)).

Die Ergebnisse wurden mit einem selbst hergestellten löslichen AK-Fragment, bestehend aus einer Zielsteuerungssequenz für die Sekretion des Antikörpers, dem fAChR-spezifischen scFv35-Fragment und dem Fc-Teil eines Antikörpers, bestätigt (Abbildung 3.1 (C)). Mit der erfolgreiche Erkennung und Bindung dieses löslichen chimären Rezeptors an den durch die RMS-Zellen exprimierten fAChR, waren gleichzeitig die Voraussetzungen (Abbildung 3.2 (A)) zur Eliminierung der Tumorzellen erfüllt.

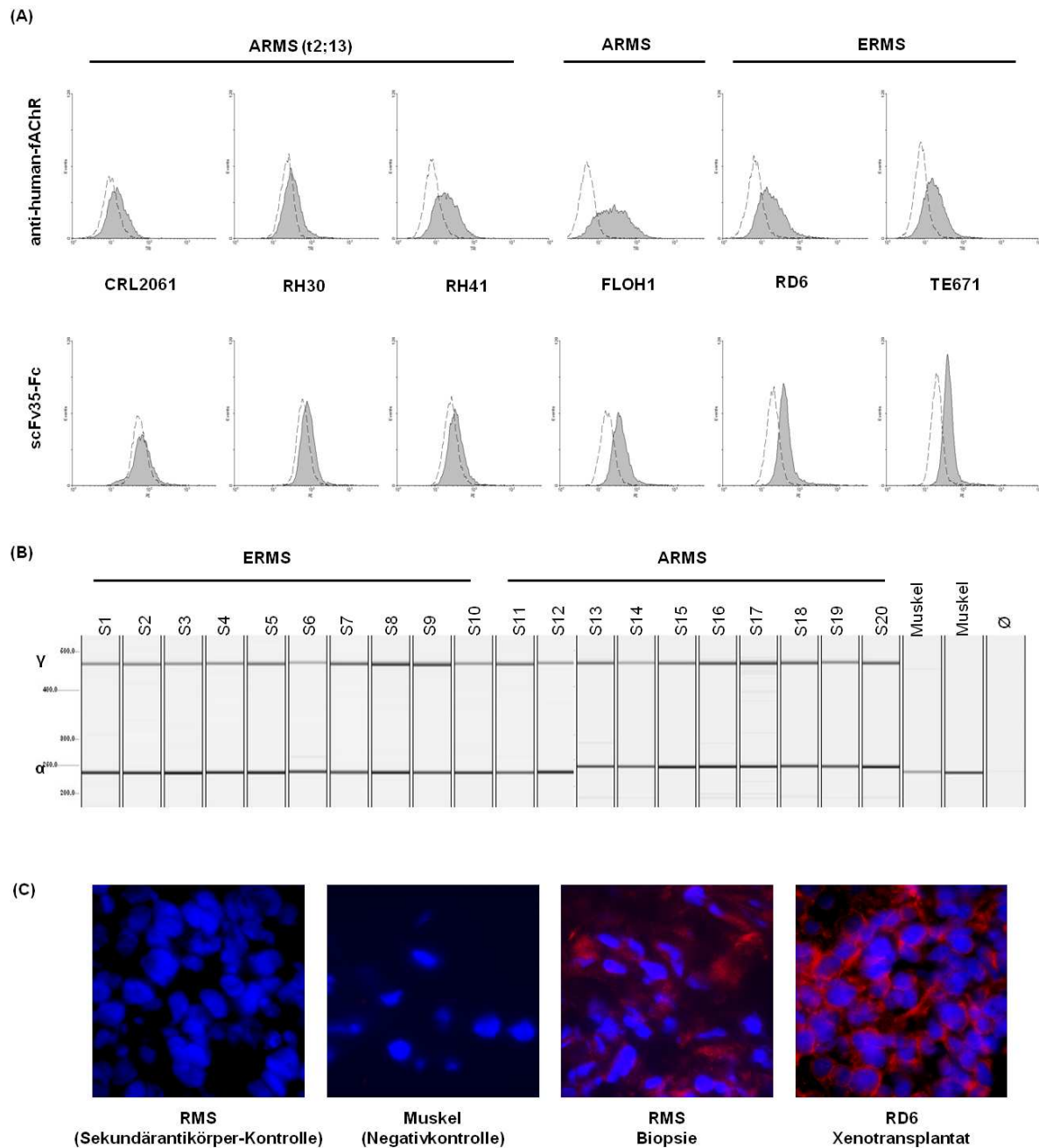


Abbildung 3.2: (A) Durchflusszytometrische Analyse der fAChR-Expression bei den verwendeten RMS-Zelllinien mit einem kommerziellen α -fAChR-AK und dem selbst hergestellten scFv35-Fc-AK; graue Histogramme entsprechen der Proteinexpression, offene gestrichelte Histogramme der Sekundärantikörper-Kontrolle. (B) Detektion der fAChR γ - und α -Untereinheit bei RMS-Patienten mittels Duplex-PCR, als Negativkontrolle diente quergestreifte Muskulatur. (C) Immunfluoreszenz-Färbung des fAChR (von links): Sekundärantikörper-Kontrolle anhand einer RMS-Biopsie, adulte Muskulatur als negative Kontrolle, RMS-Biopsie mit nur schwacher fAChR-Expression und Xenotransplantat aus der Maus mit starker fAChR-Expression; 600-fache Vergrößerung.

Der fAChR-Nachweis *in situ* erfolgte mit einer Duplex-PCR, die sowohl α - als auch γ -Untereinheit detektiert. Die PCR war so angelegt, dass sich ein 1:1 Verhältnis von α - und γ -Untereinheit bei der Analyse der ERMS-Zelllinie TE671 (als Referenzlinie) ergab²⁴⁸. Dieses Verhältnis wurde nicht bei allen, im Verlauf der Arbeit untersuchten RMS-Gewebeproben gefunden. Die Expression der γ -UE des fAChR war dennoch zweifelsfrei nachweisbar (Abbildung 3.2 (B)), während bei der, als Negativkontrolle mitgeführten Skelettmuskulatur nur die α -Untereinheit detektiert wurde.

Die Ergebnisse der Duplex-PCR wurden anhand von sechs kryoasservierten RMS-Biopsien immunhistochemisch bestätigt. Als Positivkontrolle dienten die Zelllinien RD6 und TE671, die in Vorversuchen immundefizienten NOD/SCID-Mäusen *subcutan* injiziert worden waren (Abschnitt 3.7). Adulte Skelettmuskulatur wies keine fAChR-Expression auf (Abbildung 3.2 (C)).

3.2.2 Expression der CAR auf Effektor-T-Zellen

Für die Expression des chimären Rezeptors wurden reife CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ausgewählt. Dazu wurden periphere Blutlymphozyten (PBL) isoliert und unter Zugabe von stimulierenden CD3- und CD28-Antikörper kultiviert, wodurch den T-Zell-Subpopulationen ein Selektionsvorteil gewährt wurde. Da eine langfristige Expression des chimären Rezeptors erwünscht war und die Transfektion von Primärkulturen mit den gängigen Methoden schwierig ist, wurden die Blutlymphozyten mittels retroviraler Transduktion mit der Rezeptor-DNA versehen.

Die Infektion der peripheren Blutlymphozyten erfolgte durch die Kokultivierung von Verpackungszelllinie und PBLs über einen Zeitraum von 48 h. Die aus der Transduktion resultierende Anzahl rezeptortragender T-Zellen wurde über eine CD3/IgG-Doppelfärbung ermittelt. Diese Färbung erlaubt die Abgrenzung CAR-positiver T-Zellen von CD3-negativen Immunzellen wie Makrophagen und B-Zellen, die Populationen innerhalb der isolierten PBL bilden. Dabei wiesen durchschnittlich 30-50% der T-Zellen die Expression des chimären Rezeptors auf der Zelloberfläche auf. Die Expressionsrate des „CD28-CD3 ζ “-Konstrukts war dabei besser als die des „CD3 ζ -only“-CAR (Abbildung 3.3).

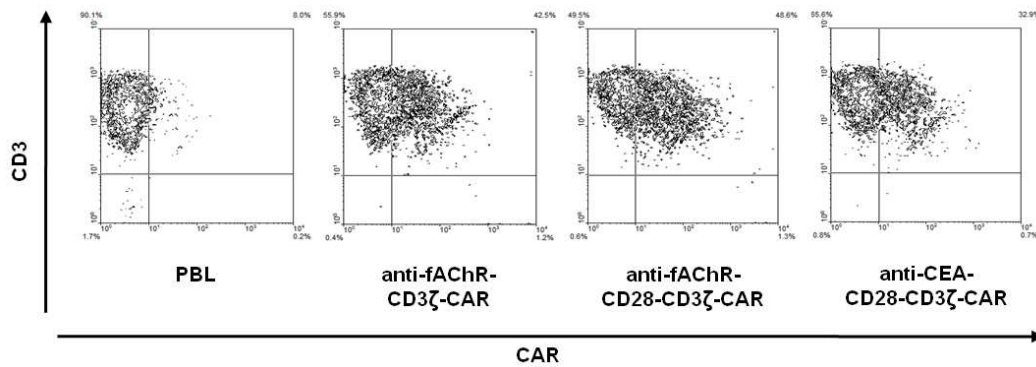


Abbildung 3.3: „Density Blot“ der CAR-Expression auf der Oberfläche peripherer Blutlymphozyten. Dargestellt ist die Expression verschiedener Rezeptorkonstrukte, inklusive nicht-transduzierter PBL. Der durchflusszytometrische Nachweis der T-Zellen erfolgt über eine CD3-Rezeptorfärbung. Der Antigenrezeptor auf der Oberfläche der T-Zellen wurde über die Färbung der extrazellulären IgG-Domäne detektiert.

3.2.3 Aktivierungsstatus von PBLs und chimären T-Zellen

Ein Vergleich der beiden Aktivitätsmarker CD25 und CD69 bei nicht-transduzierten und chimären T-Zellen konnte zeigen, dass sich das Aktivitätsprofil der T-Zellen nach der Transduktion nicht verändert.

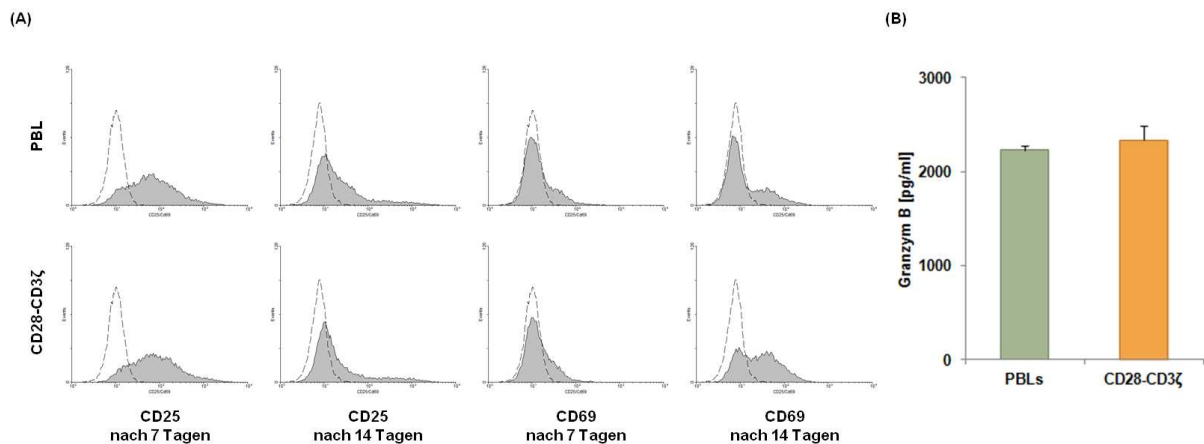


Abbildung 3.4: (A) Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf der Oberfläche nicht-transduzierter (PBL) und CAR-transduzierter (CD28-CD3ζ) PBL. Graue Histogramme entsprechen der Proteinexpression, offene gestrichelte Histogramme der Isotyp-Kontrolle. (B) Detektion der Granzym B-Sekretion in den Kulturüberstand CD3- und CD28-aktiver humaner PBL und chimärer T-Zellen nach 14-tägiger Kultivierung in IL-2-haltigem Medium (400 U/ml); die Daten repräsentieren den Mittelwerte aus Triplikaten sowie den Standardfehler des Mittelwertes.

Beide Populationen wiesen eine zeit- bzw. kultivierungsabhängige Expression von CD25 und CD69 auf, die im Falle des IL-2-Rezeptors CD25 über die Zeit abnahm, während der Aktivierungsmarker CD69 mit zunehmender Kultivierungsdauer eine Expressionsteigerung (Abbildung 3.4 (A)) erfuhr.

Die Aktivierung der PBLs durch IL-2, anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper führte zudem zu einer gesteigerten Granzym B-Sekretion²⁴⁹, die mit einem ELISA überprüft wurde. Abbildung 3.4 (B) zeigt ähnliche Mengen sekretierten Granzym B bei nicht-transduzierten PBLs und „CD28-CD3 ζ “-exprimierenden chimären T-Zellen.

3.2.4 Funktionalität des CAR abhängigen Signalwegs in chimären T-Zellen

Die Funktionalität der chimären Rezeptoren wurde über die Stimulation der extrazellulären IgG-„hinge“-Region mit einem IgG-AK überprüft. Die Aktivierung des Rezeptors führt bei einem intakten Signaltransduktionsweg zur Sekretion von IFN γ in den Kulturüberstand. Der Versuchsaufbau sollte die Aktivierung der T-Zellen nach Bindung des Target-Antigen durch den CAR simulieren. Eine IFN γ -Sekretion wurde dabei sowohl für den „CD3 ζ -only“- als auch „CD28-CD3 ζ “-CAR detektiert (Abbildung 3.5). Im Falle des „CD28-CD3 ζ “-CAR war ab einer IgG-Antikörperkonzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ ein stärkerer Anstieg der IFN γ -Sekretion zu beobachten, als für den „CD3 ζ -only“-CAR (Faktor 2-5).

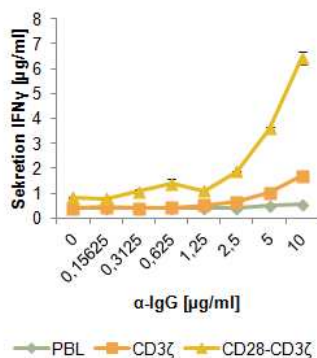


Abbildung 3.5: Stimulation von nicht-transduzierten (PBL) sowie mit dem „CD3 ζ -only“- und dem „CD28-CD3 ζ “-CAR transduzierten T-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen α -hIgG-AK über einen Zeitraum von 48 h. Die Aktivierung des Rezeptors über die IgG-„hinge“-Region führt zur Sekretion von IFN γ und dient der Demonstration eines intakten Signaltransduktionsweges des CAR. Die Daten repräsentieren jeweils die Mittelwerte aus Triplikaten und die Standardabweichung der Mittelwerte.

Die vorangegangenen Kapitel zeigen, dass mit der Expression eines funktionellen CAR auf der Oberfläche von PBLs, der Erkennung des Zielantigens durch den chimären Rezeptor sowie der Expression des Antigens auf der Oberfläche der RMS-Zelllinien, alle essentiellen Voraussetzungen für eine effektive Zelllyse der RMS-Zellen durch chimäre T-Zellen erfüllt sind. Zur Überprüfung der Rezeptorspezifität wurden im nächsten Schritt die beiden chimären Antigenrezeptoren gegen fAChR-exprimierende HEK-Zellen eingesetzt.

3.2.5 Nachweis der Spezifität des CAR gegenüber fAChR

293T-Zellen – die natürlicherweise weder den adulten noch den fetalen AChR exprimieren – wurden mit den fAChR-Untereinheiten $\alpha\beta\gamma$ und δ kotransfiziert und über einen Zeitraum von 48 h inkubiert (Abbildung 3.6). Die durch die Kotransfektion der AChR-Untereinheiten in

293T-Zellen erzielte und durchflusszytometrisch quantifizierte Expression des fAChR erreichte das gleiche Expressionsniveau wie es durchflusszytometrisch bei den RMS-Zelllinien RH41, FLOH1, RD6 und TE671 nachweisbar war (Abbildung 3.2). In fünf unabhängigen Versuchen wurden die α - und γ -Untereinheit des fAChR jeweils in 70 – 90% der transfizierten HEK-Zellen nachgewiesen. Eine Kultivierung von mehr als 96 h wurde aufgrund des transienten Charakters der Transfektion vermieden.

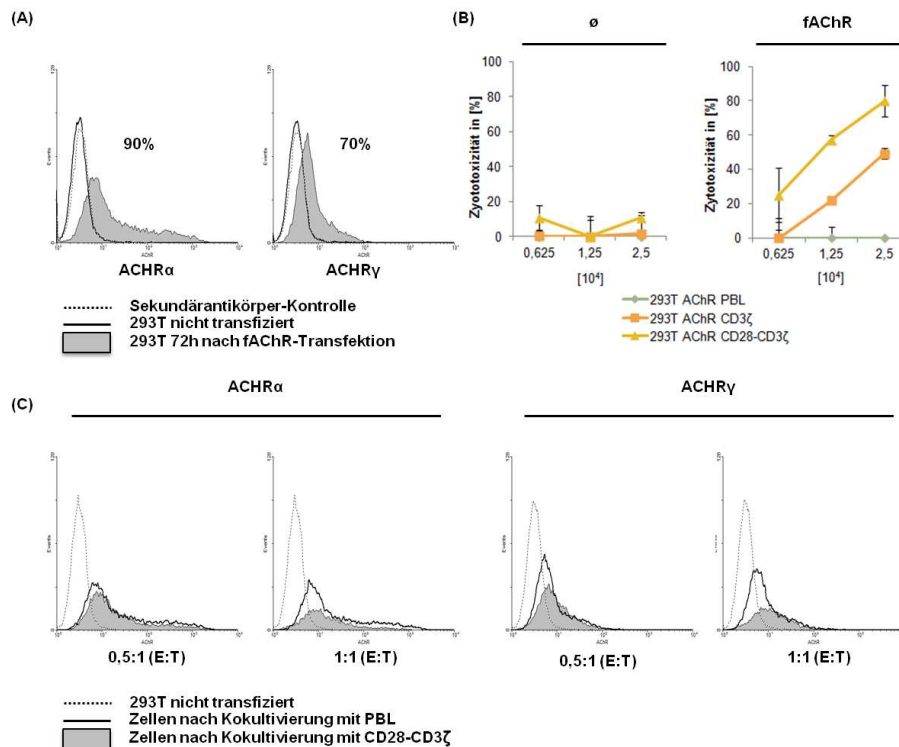


Abbildung 3.6: Expression des fAChR durch 293T-Zellen 72 h nach Transfektion der verschiedenen AChR-Rezeptoruntereinheiten ($\alpha\beta\gamma\delta$). (A) Expressionsraten der α - und γ -Untereinheit; die grauen Histogramme entsprechen der AChR-Expression 72 h nach der Transfektion, offene Histogramme der Expression nicht-transfizierter 293T-Zellen und offene, gestrichelte Histogramme der Sekundärantikörper-Kontrolle (B) MTT-Zytotoxizitätstest von fAChR-transfizierten und nicht-transfizierten 293T-Zellen (je 1×10^4 Zellen/well) 48 h nach Kokultivierung mit einer unterschiedlichen Anzahl chimärer T-Zellen. Die Zytotoxizität nicht-transduzierter T-Zellen wurde bei 0% festgelegt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikaten sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte. (C) Durchflusszytometrische Analyse des fAChR 24 h nach Inkubation mit chimären T-Zellen in verschiedenen Effektor:Targetzellverhältnissen (E:T).

Während die nicht-transfizierten 293T-Zellen nach der Kokultivierung mit den chimären T-Zellen keine verminderte Überlebensrate aufwiesen, wurden die fAChR⁺ 293T-Zellen sowohl von dem „CD3 ζ -only“-CAR als auch von dem modifizierten „CD28-CD3 ζ “-CAR erkannt und eliminiert. Dabei ist die Zytotoxizität beider chimärer Rezeptoren dosisabhängig und weist die höchste Effektivität bei einem Effektor:Targetzellverhältnis von 2,5:1 (E:T) auf.

Mit dem „CD3 ζ -only“-CAR wurden bei dieser Zelldichte Zytotoxizitätsraten von bis zu 50% erreicht, während mit dem „CD28-CD3 ζ -CAR Zytotoxizitätsraten von bis zu 80% möglich waren (Abbildung 3.6 (B)). Durchflusszytometrische Analysen der transfizierten 293T-Zellen nach 24-sündiger Kokultivierung mit den chimären T-Zellen zeigten bei einem E:T-Verhältnis von 1:1 eine Abnahme der fAChR-exprimierenden Zellen (Abbildung 3.6 (C)).

3.3 Interaktion von chimären T-Zellen und NKT-Zellen mit RMS-Zellen

3.3.1 Zytotoxizität chimärer T-Zellen gegenüber fAChR-exprimierenden Zellen

Im nächsten Schritt wurden die RMS-Zelllinien mit chimären T-Zellen, die zum einen den „CD3 ζ -only“-CAR zum anderen den „CD28-CD3 ζ -CAR exprimierten, kokultiviert. Während die mit „CD3 ζ -only“-CAR ausgestatteten T-Zellen die RMS-Zellen nur mäßig eliminierten, zeigten die mit dem „CD28-CD3 ζ -CAR versehenen T-Zellen eine bessere Effektivität bei den alveolären Linien CRL2061, RH30, RH41 und FLOH1. Im Gegensatz dazu wurde die Zytotoxizität gegenüber den beiden embryonalen RMS-Zelllinien RD6 und TE671 durch die zusätzliche CD28-Domäne nicht maßgeblich gesteigert (Abbildung 3.7 (A)). Dabei war die beobachtete Lyserate nicht alleine von der Expressionsstärke des Target-Antigens abhängig, da die beiden ARMS-Zelllinien CRL2061 und RH30 mit geringer fAChR-Expression besser eliminiert wurden als die beiden ERMS-Linien RD6 und TE671, die den fAChR stark exprimierten (Abbildung 3.2).

Die unterschiedlich starken Lyseraten durch den „CD28-CD3 ζ -CAR bzw. „CD3 ζ -only“-CAR korrelierten teilweise mit der IFN γ -Sekretion, die als Maß für die Aktivität der chimären T-Zellen (Abschnitt 3.2.4) bestimmt wurde²⁵⁰. Dabei zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Aktivierung der chimären T-Zellen vom jeweils exprimierten CAR. Während Zellen mit dem „CD3 ζ -only“-CAR eine IFN γ -Sekretion im Bereich von 50-400 pg/ml zeigten, wiesen Zellen mit dem „CD28-CD3 ζ -CAR eine 10-fach höhere IFN γ -Sekretion auf (Abbildung 3.7 (B)). Eine Ausnahme bildete die alveoläre Zelllinie RH30, bei der nach Kokultivierung mit chimären T-Zellen keine IFN γ -Sekretion festgestellt werden konnte.

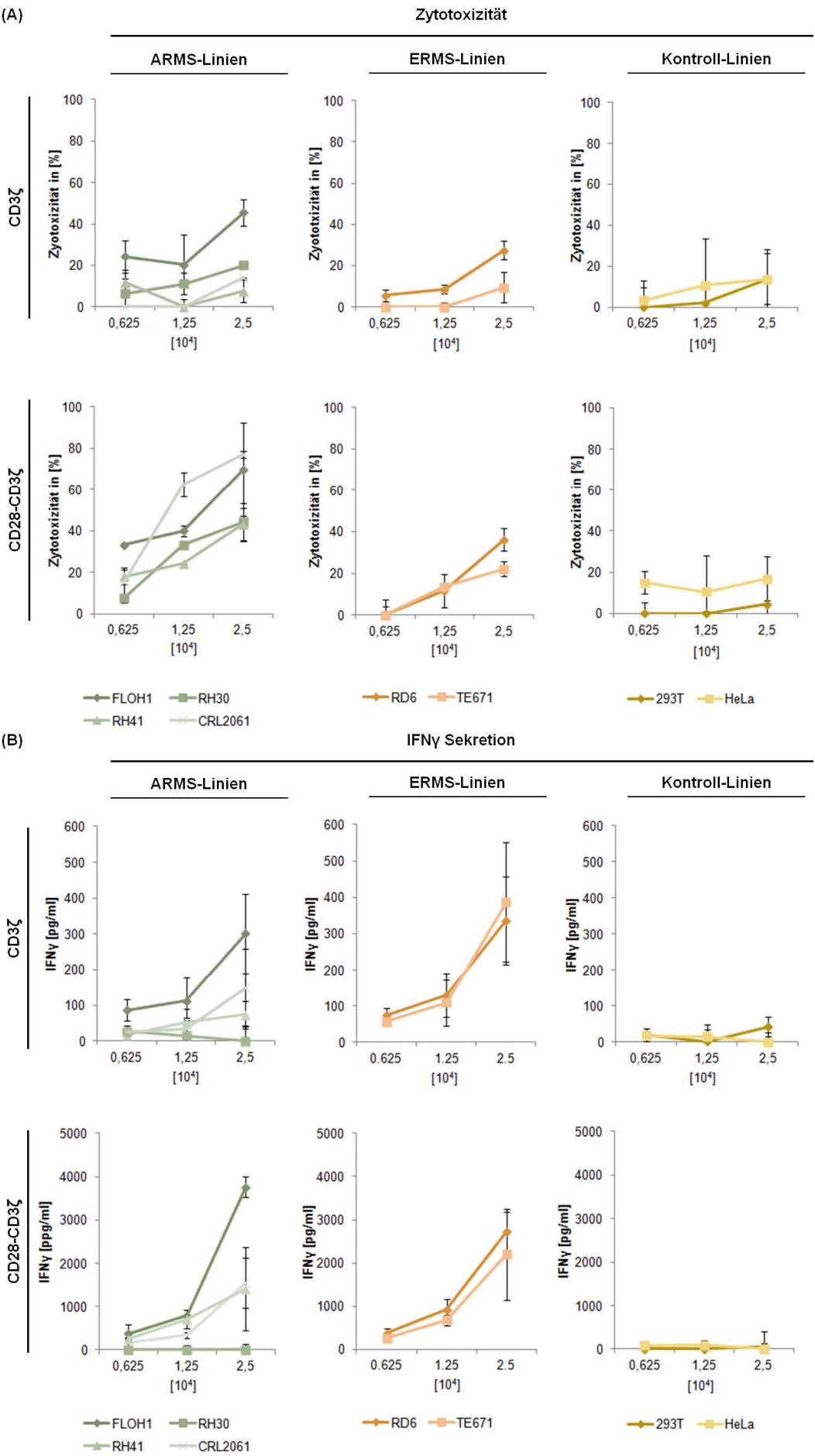


Abbildung 3.7: (A) MTT-Zytotoxizitätstest von RMS-Zellen (1×10^4 Zellen/well) 48 h nach der Kokultivierung mit einer unterschiedlichen Anzahl fAChR-spezifischer chimärer T-Zellen. Die Zytotoxizitätsrate nicht-transduzierter PBLs wurde mit 0% angenommen. Als fAChR-negative Kontrollen dienten die Zelllinien HEK und HeLa. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus Triplikaten sowie den Standardfehler des Mittelwertes. (B) Die Kulturüberstände aus (A) wurden zur Darstellung der T-Zell Aktivität auf die Sekretion von IFN γ untersucht. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus Triplikaten sowie den Standardfehler des Mittelwertes. Die Skala der IFN γ -Sekretion unterscheidet sich bei dem „CD28-CD3 ζ “-Konstrukt von dem „CD3 ζ -only“-Konstrukt um den Faktor 10.

Die proapoptotische Wirkung der chimären T-Zellen auf die RMS-Zelllinien wurde durchflusszytometrisch anhand einer Annexin V/Propidiumiodid (PI)-Doppelfärbung belegt.

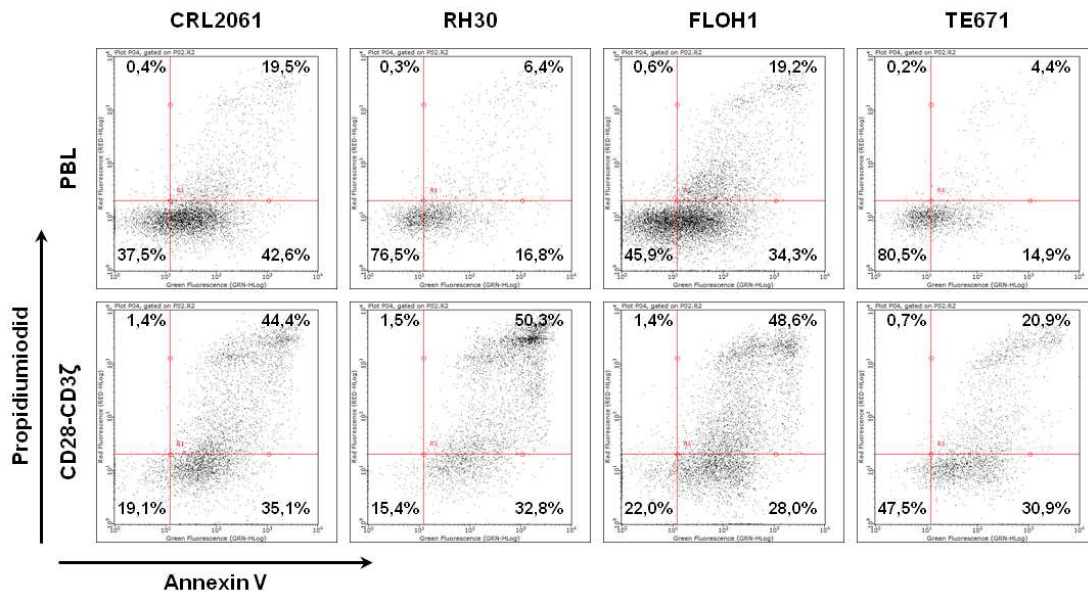


Abbildung 3.8: „Dot Blot“ einer Annexin V/PI-Doppelfärbung von CRL2061, RH30, FLOH1 und TE671 nach Kokultivierung (24 h) mit nicht-transduzierten PBLs und chimären „CD28-CD3 ζ “-T-Zellen in einem Effektor:Targetzellverhältnis von 1:1; PI – Propidiumiodid.

Abbildung 3.8 zeigt exemplarisch vier der sechs RMS-Zelllinien. Bei allen vier Zelllinien ist eine deutliche Zunahme sowohl Annexin V einfach positiver (früh-apoptotischer) als auch doppelt-positiver (spät-apoptotischer und nekrotischer) Zellen nach der Inkubation mit den chimären T-Zellen zu beobachten.

3.3.2 Zytotoxizität chimärer NKT-Zellen gegenüber fAChR-exprimierenden Zellen

Die unter Abschnitt 3.3.1 beschriebene Transduktion zytotoxischer T-Zellen mit einem CAR ist infolge der einfachen und schnellen Erzeugung von zytotoxischen T-Zell-Subpopulationen weit verbreitet. Die Anreicherung anderer Subpopulationen wie Zytokin-induzierte Killerzellen (CIK) oder NK-Zellen ist aufgrund der komplexen Stimulation mit diversen Zytokinen schwieriger und erfordert mehr Zeit. Da im Rahmen dieser Arbeit auf die Testung dieser Populationen nicht verzichtet werden sollte, wurde die Generierung chimärer CIK-Zellen angestrebt: CIK-Zellen stellen eine heterogene Zellpopulation dar, die sowohl T-Zell- als auch NK-Zell-Charakteristika in sich vereint²⁵¹. Die im Verlauf der Arbeit erhaltenen Zellpopulationen beinhalten eine Mischung aus NKT- ($CD16^+CD56^+CD3^+$), CIK- ($CD16^+CD56^+CD3^+$) und einfachen T-Zellen ($CD16^-CD56^-CD3^+$) (Abbildung 3.9).

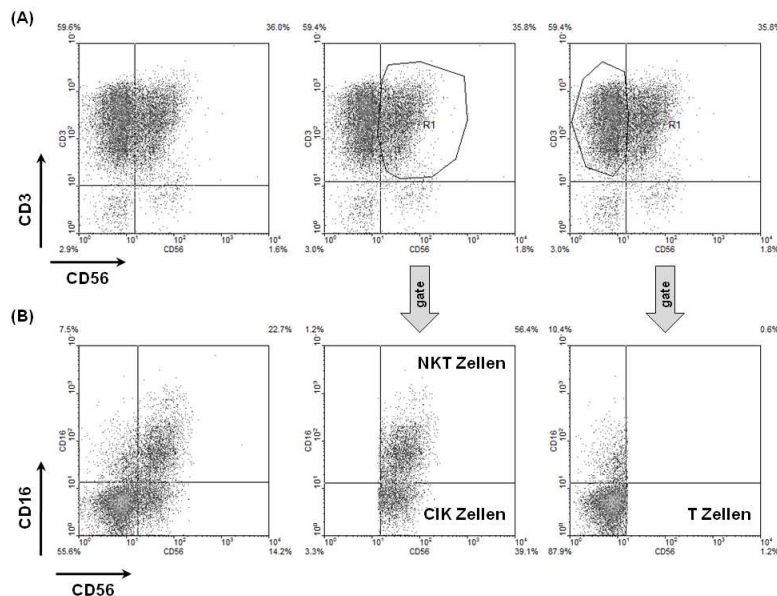


Abbildung 3.9: Durchflusszytometrischer Nachweis einer Mischpopulation aus Zytokin-induzierten Killerzellen (CIK) ($CD3^+CD56^+CD16^-$), T-Zellen ($CD3^+CD56^-CD16^-$) und NKT-Zellen ($CD3^+CD56^+CD16^+$). (A) „Density Blot“ einer CD3/CD56-Doppelfärbung. (B) „Density Blot“ einer CD16/CD56-Doppelfärbung. Die Abgrenzung der verschiedenen Zellpopulationen erfolgte nach dem setzen eines Gates der CD56-positiven bzw. -negativen Subpopulation aus (A).

Die Transduktion dieser Mischpopulation gelang nur in Verbindung mit dem „CD28-CD3 ζ “-Konstrukt in zufriedenstellendem Ausmaß.

Abbildung 3.10 (A) zeigt die verschiedenen Zellpopulationen von nicht-transduzierten und transduzierten Zellen. Nach der Transduktion konnten 1. $CD56^+/IgG^+$ doppelt-positive NKT/CIK-Zellen, 2. $CD56^-/IgG^+$ chimäre T-Zellen und 3. $CD56^+$ einfach positive (also nicht-transduzierte NKT/CIK-Zellen) voneinander unterschieden werden.

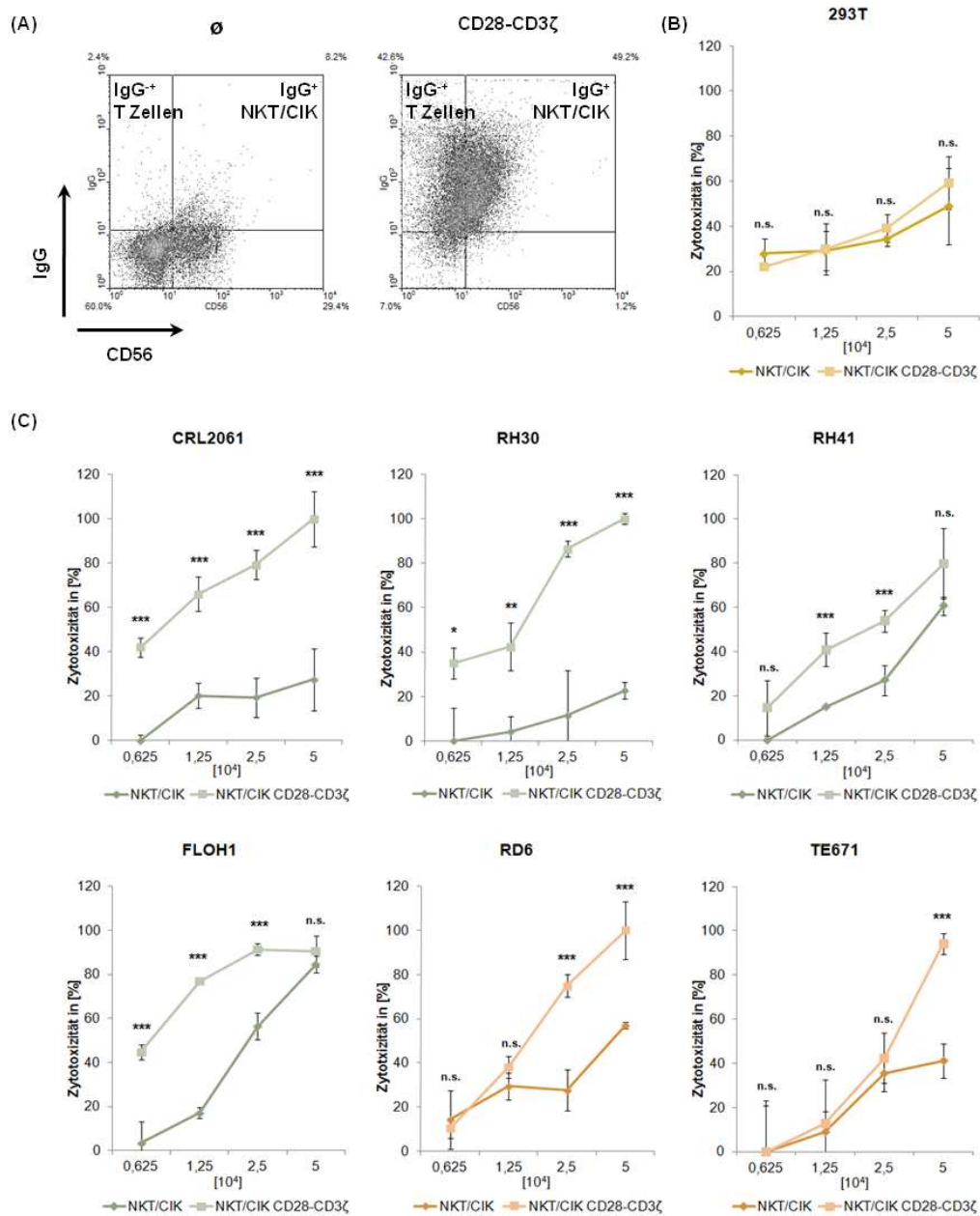


Abbildung 3.10: (A) Durchflusszytometrische Analyse einer Mischpopulation von PBLs nach der Transduktion mit dem „CD28-CD3ζ“-CAR. Der gezeigte „Density Blot“ dient der Unterscheidung von CD56⁺IgG⁺ („CD28-CD3ζ“) doppelt-positiven NKT/CIK-Zellen, CD56⁺IgG⁺ chimären T-Zellen und CD56⁺IgG⁻ nicht-transduzierten NKT/CIK-Zellen. (C) MTT-Zytotoxizitätstest von RMS-Zellen (1x10⁴ Zellen/well) 48 h nach der Kokultivierung mit einer unterschiedlichen Anzahl an fAChR-spezifischen chimären NKT/CIK-Zellen und nicht-transduzierten NKT/CIK-Zellen. Zur Kontrolle wurden fAChR-negative 293T-Zellen mitgeführt (B). Die Zytotoxizität nicht-transduzierter PBL wurde mit 0% angenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikaten sowie die Standardabweichungen des Mittelwertes.

Die in Abbildung 3.10 gezeigten Zytotoxizitätsraten beziehen sich auf die, für PBLs festgelegte Lyserate von 0%. Dabei wird ersichtlich, dass die generierte Mischpopulation aus nicht-

transduzierten NKT/CIK-Zellen grundsätzlich eine höhere Zytotoxizität gegenüber RMS-Zellen aufwiesen als nicht-transduzierte zytotoxische T-Zellen. Die beobachteten Lyseraten lagen bei einem Effektor:Targetzellverhältnis von 5:1 bei 20% für die ARMS-Linien CRL2061 und RH30 und bei 80% für FLOH1.

Die Transduktion der NKT/CIK-Zellen mit dem „CD28-CD3ζ“-CAR führte zu einer signifikanten Steigerung der zytotoxischen Wirkung. Insbesondere bei den untersuchten ARMS-Zelllinien und der ERMS-Zelllinie RD6 wurden Zytotoxizitätsraten von 20% bis 100% nachgewiesen (Abbildung 3.10 (C)). Bei der Zelllinie TE671 wurde hingegen erst ab einem Effektor:Targetzellverhältnis von 2,5:1 eine verbesserte Lyserate beobachtet, die ab einem Verhältnis von 5:1 signifikant wurde. Im Gegensatz zu den untersuchten RMS-Zelllinien wurde bei der fAChR-negativen HEK-Zelllinie 293T keine Steigerung der Zelllyserate nach der Kokultivierung mit chimären NKT/CIK-Zellen beobachtet (Abbildung 3.10 (B)).

Die in den Abschnitten 3.3.1 und 3.3.2 dargestellten Lyseraten stellen repräsentative Ergebnisse aus mehreren unabhängigen Versuchen dar. Erwähnenswert ist hierbei die Tatsache, dass die Aktivität der jeweiligen NKT/CIK- und T-Zellpopulationen stark spenderabhängig ist und dadurch leichte Abweichungen bei den Zytotoxizitätsraten entstehen. Um eine zu hohe Variabilität zu vermeiden, stammen die für einen Versuchsdurchlauf verwendeten PBL sowie NKT/CIK- und transduzierten NKT/CIK-Zellen jeweils von demselben Spender.

Insgesamt waren die Lyseraten für einige RMS-Zelllinien, insbesondere bei der Verwendung chimärer T-Zellen (Abschnitt 3.3.1), nicht so gut wie erhofft und variierten stark zwischen den verschiedenen Linien (Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2). Als mögliche Ursachen des schlechten Ansprechens wurden Zelllinien-spezifische Resistenzmechanismen ebenso wie einen Einfluss immunologisch relevanter Oberflächenmoleküle erwogen, die im Folgenden untersucht wurden.

3.4 Expression immunrelevanter Oberflächenmoleküle bei RMS

Für die Interaktion von Tumor- und Immunzellen sind zahlreiche Oberflächenmoleküle von Bedeutung. Neben den eigentlichen Zielstrukturen zytotoxischer T-Zellen, spielen für eine optimale T-Zellaktivierung und zytotoxische Funktion die Expression inhibitorischer und kostimulatorischer oder adhäsionsfördernder Oberflächenmoleküle eine wesentliche Rolle²⁵². Solche Moleküle können wechselseitig auf Lymphozyten und ihren Zielzellen vorkommen, teilweise im Sinne von Rezeptor-Liganden-Paaren, teilweise als Moleküle mit homotypischen Bindungseigenschaften. Bislang fehlen für Rhabdomyosarkome Expressionsdaten zu immunologisch relevanten Oberflächenmolekülen die Einfluss auf die Wechselwirkung

zwischen Tumorzellen und Immunsystem nehmen können. Dabei könnten entsprechende Kenntnisse über das Expressionsprofil von RMS die Etablierung einer adoptiven Immuntherapie vereinfachen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression einiger dieser Interaktionsmoleküle auf RMS-Zellen analysiert.

Aufgrund der nahen Verwandtschaft von RMS- und Muskelzellen wurden solche Moleküle ausgewählt, die bei inflammatorischen Muskelerkrankungen bekanntermaßen einen Einfluss auf die Interaktion zwischen Muskelgewebe und Immunzellen haben^{160 164}. Dazu gehören die MHC-I- und MHC-II-Moleküle, die Kostimulatoren B7.1 (CD80), B7.2 (CD86) und B7H2 (ICOS-L), die Adhäsionsmoleküle CD54 (ICAM-1) und CD56 (NCAM) sowie die inhibitorischen Oberflächenmoleküle B7H1 und B7H3. Die Interaktionspartner der jeweiligen Rezeptoren sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.2: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit analysierten kostimulatorischen und inhibitorischen Oberflächenmolekülen sowie deren Interaktionspartner auf der Oberfläche von T-Zellen

<i>Kostimulatorische Oberflächenmoleküle</i>	<i>Inhibitorische Oberflächenmoleküle</i>
<i>Tumorzelle – T-Zelle</i>	<i>Tumorzelle – T-Zelle</i>
MHC-I bzw. MHC-II – T-Zell-Rezeptor	B7H1 (PD-1L) – PD1
B7H1* bzw. B7H2** – CD28, CTLA-4	B7H3 – nicht bekannt
B7H2 (ICOS-L) – ICOS	
CD54 (ICAM-1) – LFA-1, MAC-1	
CD56 (NCAM-1) – NCAM-1 (CIKs***)	

*CD80, **CD86, ***CIKs, Zytokin induzierte Killerzellen (*cytokine induced killer cells*) - T-Zell Subpopulation, die durch die Behandlung mit Zytokinen aus PBL expandiert werden konnte.

3.4.1 Expression von MHC-Molekülen

Die antigenspezifische Interaktion von T-Zellen mit anderen körpereigenen Zellen erfolgt zwischen MHC-Peptidkomplexen und jeweils spezifischen T-Zellrezeptoren (TCR), was eine Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden oder infizierten Zellen erlaubt. Der Verlust der MHC-Expression stellt einen, bei Tumoren weit verbreiteten, „*immune escape*“-Mechanismus dar und schützt so vor einer tumorspezifischen T-Zell-vermittelten Immunantwort. Obwohl für eine chimäre T-Zelltherapie nicht relevant, wurde die MHC-I-Expression aufgrund ihrer Bedeutung für die normale Immunantwort überprüft.

MHC-I- und MHC-II-Expression: RMS-Zelllinien zeigten, mit Ausnahme der ARMS-Zelllinie CRL2061, eine spontane und starke MHC-I-Oberflächenexpression, während MHC-II

lediglich von der translokations-negativen Zelllinie FLOH1 exprimiert wurde. Die beobachtete MHC-II-Expression wurde dabei von der Serumverfügbarkeit beeinflusst und erst nach einer mindestens 24 h andauernden Inkubation in Hungermedium (1% FBS) beobachtet (Abbildung 3.11).

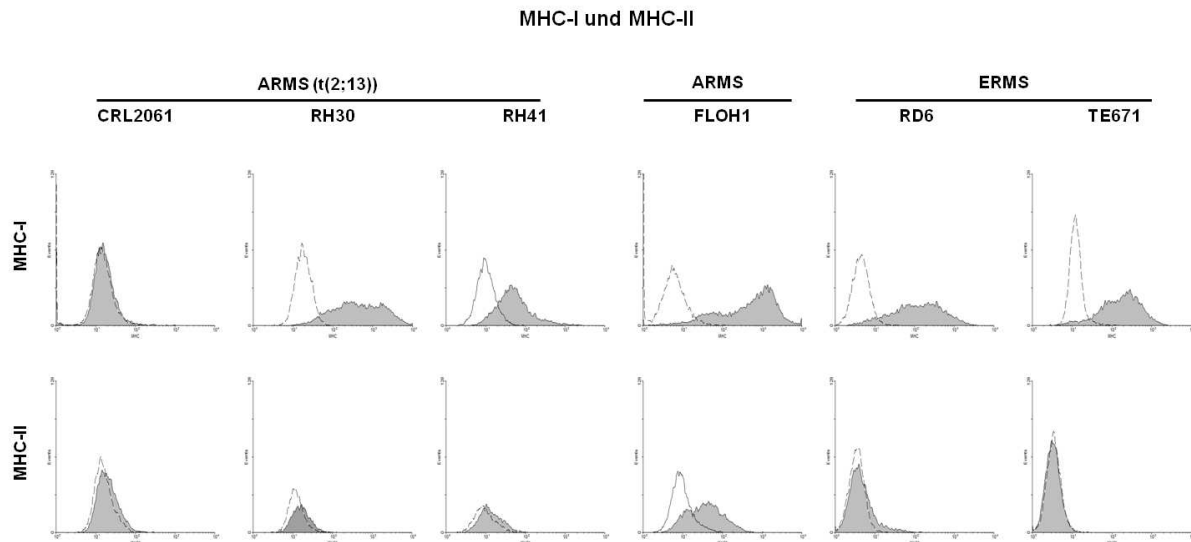


Abbildung 3.11: Durchflusszytometrische Analyse der MHC-I- und MHC-II-Expression auf der Oberfläche von RMS-Zelllinien. Die Zellen wurden vor der Färbung für 48 h in Hungermedium (1% FBS) inkubiert; graue Histogramme entsprechen der Proteinexpression, offene gestrichelte Histogramme der Sekundärantikörper Kontrolle.

Die MHC-Expression *in situ* wurde anhand von ERMS-Biopsien ($n = 4$) im Western Blot sowie mittels qRT-PCR an ERMS- ($n = 10$) und ARMS-Biopsien ($n = 10$) untersucht und mit der Expression bei normaler Skelettmuskulatur verglichen (Abbildung 3.12).

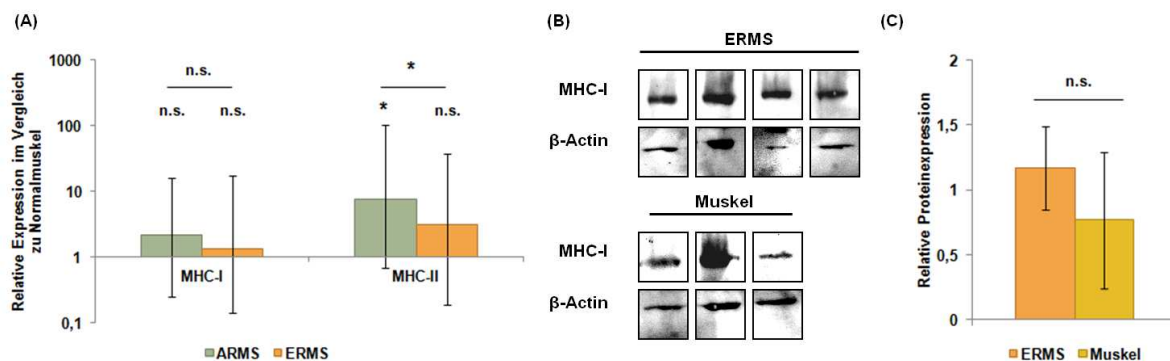


Abbildung 3.12: MHC-I und MHC-II-Expression bei RMS-Geweben. (A) qRT-PCR zum Nachweis von MHC-I und MHC-II bei ARMS (n = 10) und ERMS (n = 10) im Vergleich zu gesunder Skelettmuskulatur (n = 5) (RQ = 1), als Referenzgen diente GAPDH; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,005. (B) Western Blot der MHC-I-Expression bei ERMS-Frischgewebe (n = 4) im Vergleich zu gesunder Skelettmuskulatur (n = 3); als Ladekontrolle diente β -Aktin. (C) Quantitative Auswertung der MHC-I-Proteinexpression des in (B) dargestellten Western Blots.

Die MHC-I-Expressionsstärke bei RMS-Biopsien entsprach sowohl auf transkriptioneller als auch Protein-Ebene derjenigen der mitgeführten Skelettmuskulatur. Die quantitative Bestimmung der mRNA erbrachte des Weiteren keinen signifikanten Expressionsunterschied zwischen den beiden untersuchten RMS-Subtypen.

Für MHC-II wurde eine signifikant (p < 0,05) höhere Expression im Vergleich zu normaler Skelettmuskulatur nachgewiesen, wobei ARMS eine höhere Expression aufwiesen als ERMS. Ein Proteinnachweis von MHC-II bei RMS-Geweben ist im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen.

HLA-G-Expression: Neben dem Verlust der MHC-I-Expression weisen einige Tumorzellen eine verstärkte Expression des nicht klassischen MHC-I-Moleküls HLA-G auf, wodurch eine Immuntoleranz gegenüber zytotoxischen T- und NK-Zellen erzeugt wird.

Während Skelettmuskulatur (n = 5) eine ausgeprägte HLA-G-Expression zeigt, konnte das Protein in nur vergleichsweise geringem Ausmaß bei den verwendeten RMS-Zelllinien und den untersuchten RMS-Biopsien (n = 10) detektiert werden (Abbildung 3.13).

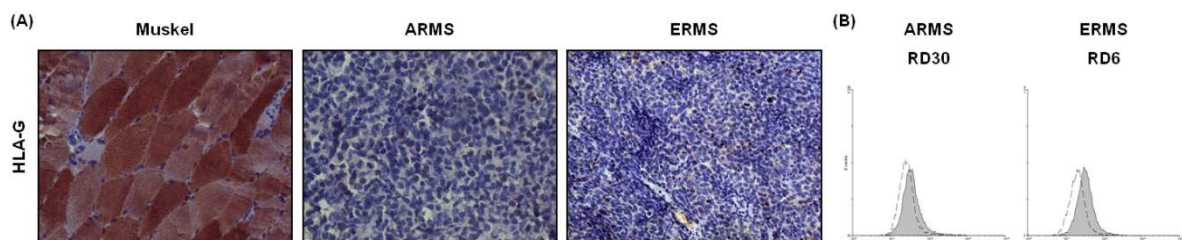


Abbildung 3.13: (A) Immunhistochemische Färbung (IHC) an Paraffingewebe zum Nachweis des nicht-klassischen MHC-I-Moleküls HLA-G. Die linke Abbildung zeigt eine stark positive HLA-G-Färbung an einer Muskelbiopsie, während ARMS und ERMS eine schwache Proteinexpression aufweisen (Immunoperoxidase, 200-fache Vergrößerung). (B) Durchflusszytometrische Analyse der HLA-G Expression bei zwei RMS-Zelllinien (RH30 und RD6); graue Histogramme entsprechen der HLA-G Expression, offene gestrichelte Histogramme der Isotyp-Kontrolle.

3.4.2 Expression kostimulatorischer Moleküle

Für die Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen ist zusätzlich die Interaktion mit diversen kostimulatorischen Molekülen, wie B7.1, B7.2 und B7H2 erforderlich, die in der Regel von antigenpräsentierenden Zellen (APC) zur Verfügung gestellt werden und bei Tumorzellen meist nicht nachweisbar sind⁷¹.

Die beiden klassischen Korezeptoren B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) wurden bei keiner der analysierten RMS-Zelllinien detektiert, während eine Expression von B7H2 bei den ARMS-Linien RH41, RH30 und FLOH1 sowie den beiden ERMS-Linien RD6 und TE671 nachweisbar war (Abbildung 3.14).

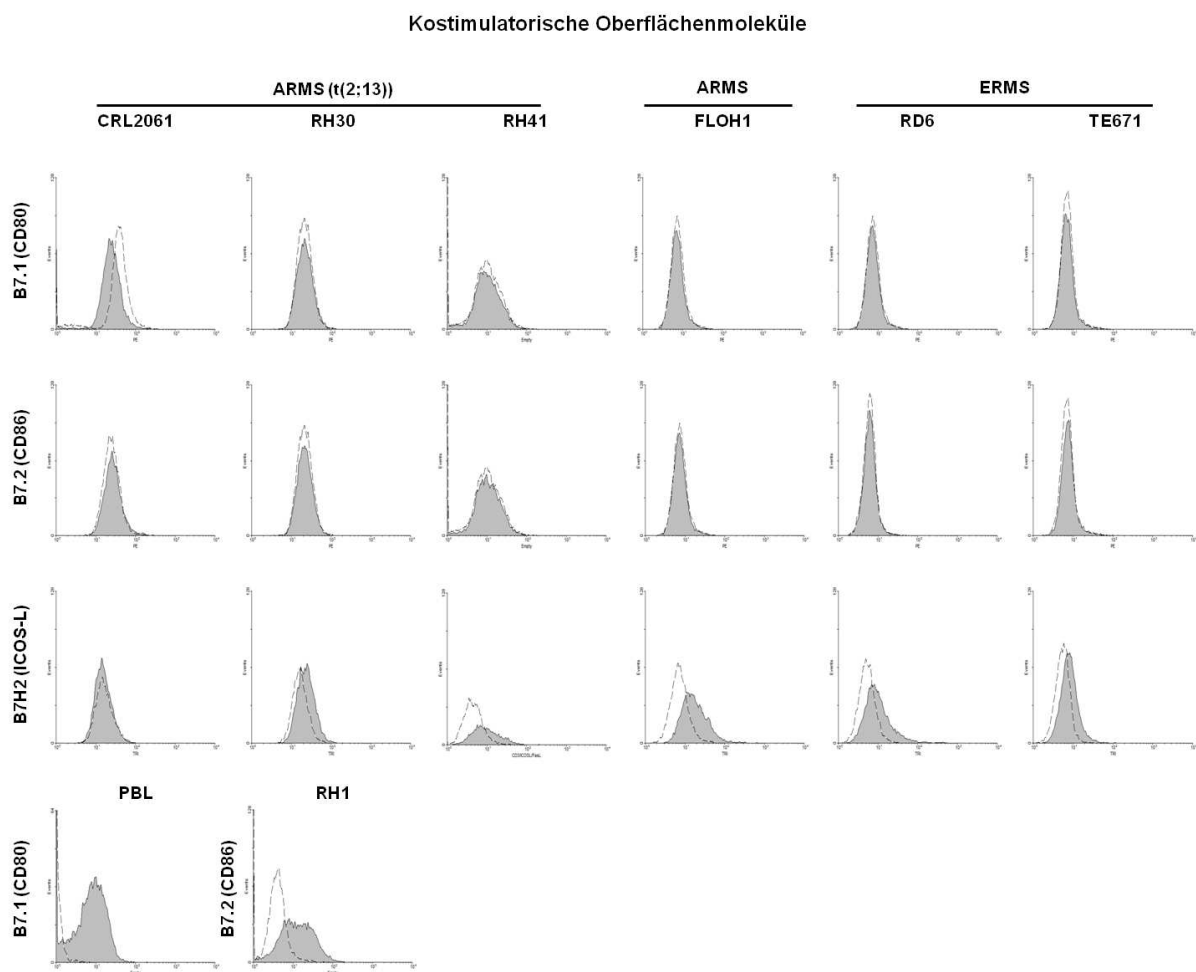


Abbildung 3.14: Expression der Korezeptoren B7.1, B7.2 und B7H2 auf der Oberfläche von RMS-Zelllinien; graue Histogramme entsprechen der Proteinexpression, offene gestrichelte Histogramme der Sekundärantikörper Kontrolle. Die beiden Abbildungen am unteren Bildrand entsprechen der Positivkontrolle für eine B7.1 Färbung an peripheren Blutlymphozyten (PBL) und einer B7.2 Färbung an der Ewing-Sarkom-Zelllinie RH1²⁵³.

B7.1 und B7.2 wurden des Weiteren bei keiner der untersuchten RMS-Biopsien (Frischgewebe n = 6; Paraffinmaterial n = 10) detektiert (Abbildung 3.15), während die Expression des nicht-

klassischen Kostimulators B7H2, ähnlich wie im Fall der untersuchten Zelllinien, sehr heterogen ausfiel (Abbildung 3.15). Von den untersuchten RMS-Paraffinproben ($n = 8$) wiesen drei der Tumore eine starke sowie drei eine schwache und zwei keinerlei B7H2 Expression auf. Für Normalmuskel wurde unter den gegebenen Bedingungen keine Expression detektiert.

Die quantitative Bestimmung der B7H2-Expression (ARMS: $n = 10$; ERMS: $n = 10$) erbrachte auf transkriptioneller Ebene eine erhöhte Expression gegenüber Normalmuskulatur, die sich zwischen den beiden histologischen Subtypen nicht unterschied.

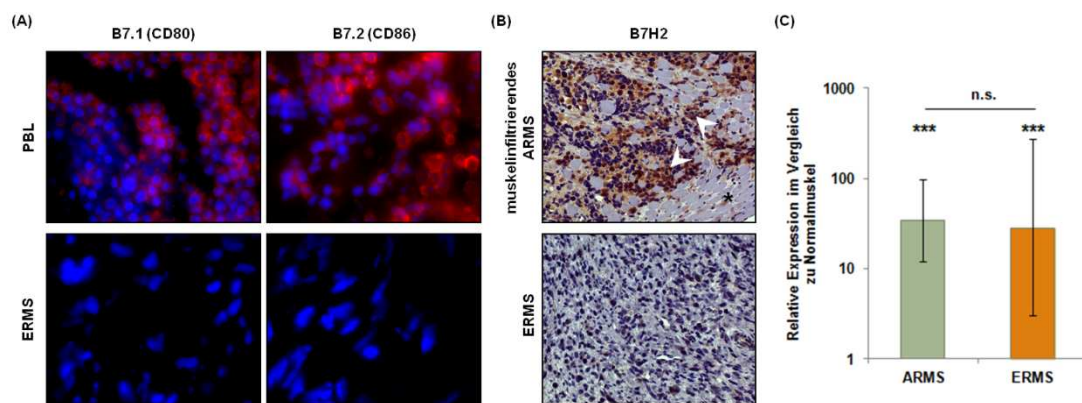


Abbildung 3.15: Expression der Korezeptoren B7.1, B7.2 und B7H2 bei RMS. (A) Immunfluoreszenzfärbung von B7.1 und B7.2 an peripheren Blutlymphozyten (PBL) (Positivkontrolle) und ERMS-Frischgewebe; die Kerngegenfärbung erfolgte mit DAPI, die Aufnahmen entstanden bei 600-facher Vergrößerung. (B) Immunhistochemische Färbung (IHC) an Paraffingewebe zum Nachweis des nicht-klassischen Kostimulators B7H2. Die obere Abbildung zeigt ein muskelinfiltrierendes ARMS (Pfeile) mit starker B7H2-Expression, während das infiltrierte Muskelgewebe selbst keinerlei Expression aufweist (Stern). Die untere Abbildung zeigt ein ERMS mit nur schwacher B7H2-Expression (Immunperoxidase; 200-fache Vergrößerung). (C) qRT-PCR zum Nachweis von B7H2 bei ARMS ($n = 10$) und ERMS ($n = 10$) im Vergleich zu gesunder Skelettmuskulatur ($n = 5$) ($RQ = 1$), als Referenzgen diente GAPDH; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

Da die Expression eines Kostimulators immunregulatorische Eigenschaften hat und im Falle von B7H2 eine extrem heterogene Ausprägung aufweist, wurden zudem die Überlebensdaten der untersuchten RMS-Biopsien mit den quantitativen Expressionsdaten für B7H2 abgeglichen. Eine Korrelation zwischen B7H2-Expressionslevel und Krankheitsverlauf konnte weder für ARMS noch für ERMS nachgewiesen werden (Abbildung 3.16)

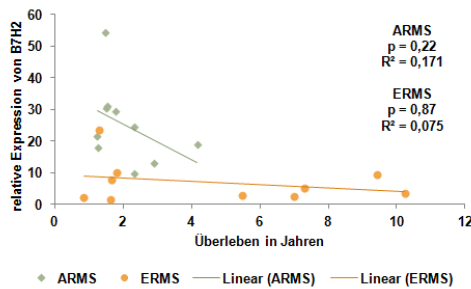


Abbildung 3.16: Zusammenhang zwischen der B7H2-Expression (ICOS-L) und der Überlebenszeit bei ERMS (n = 10) und ARMS (n = 10); die p-Werte wurden mit der Statistiksoftware SAS berechnet. R^2 – Regressionskoeffizient.

Überraschend war dennoch die Beobachtung, dass die höchsten B7H2-Expressionswerte – gerade anders als erwartet – bei Patienten mit besonders kurzer Überlebenszeit gefunden wurden.

Die fehlende Expression der beiden klassischen Kostimulatoren B7.1 und B7.2 sowie die stark variierende und letztlich mäßige Expression des dritten Kostimulators B7H2 bei den RMS-Zelllinien und Geweben könnten die beobachteten schlechten Lyseraten des „CD3 ζ -only“-CAR durch die Entwicklung einer T-Zell-Anergie erklären (Abbildung 3.7). Letztlich geklärt werden kann diese Frage allerdings nur mit einer Überexpression der Kostimulatoren und der anschließenden Kokultivierung „CD3 ζ -only“-CAR exprimierender chimärer T-Zellen, was nicht Gegenstand dieser Arbeit war. Mit der Einführung der kostimulatorischen CD28-Domäne bei Rezeptoren der zweiten Generation erfolgt die Aktivierung der chimären T-Zellen unabhängig von der Expression der oben beschriebenen Kostimulatoren und bildet damit, vor allem hinsichtlich einer therapeutische Nutzung der Rezeptoren, eine sinnvolle Alternative. Im weiteren Verlauf wurde daher vorrangig der CAR der zweiten Generation mit der kostimulatorischen CD28-Domäne verwendet.

3.4.3 Expression von Adhäsionsmolekülen bei RMS

Weiterhin wurden die beiden Adhäsionsmoleküle CD54 (ICAM-1) und CD56 (NCAM), die unter inflammatorischen Bedingung in muskulärem Gewebe exprimiert werden^{160 164 254}, bei RMS-Tumoren betrachtet.

Der Myoblasten-Marker¹⁶⁶ CD56 erbrachte, mit Ausnahme der ARMS-Zelllinie CRL2061, bei allen RMS-Zelllinien eine vergleichbar starke Oberflächenexpression, während CD54 nur bei CRL2061, nicht aber bei den anderen Zelllinien nachgewiesen wurde (Abbildung 3.17).

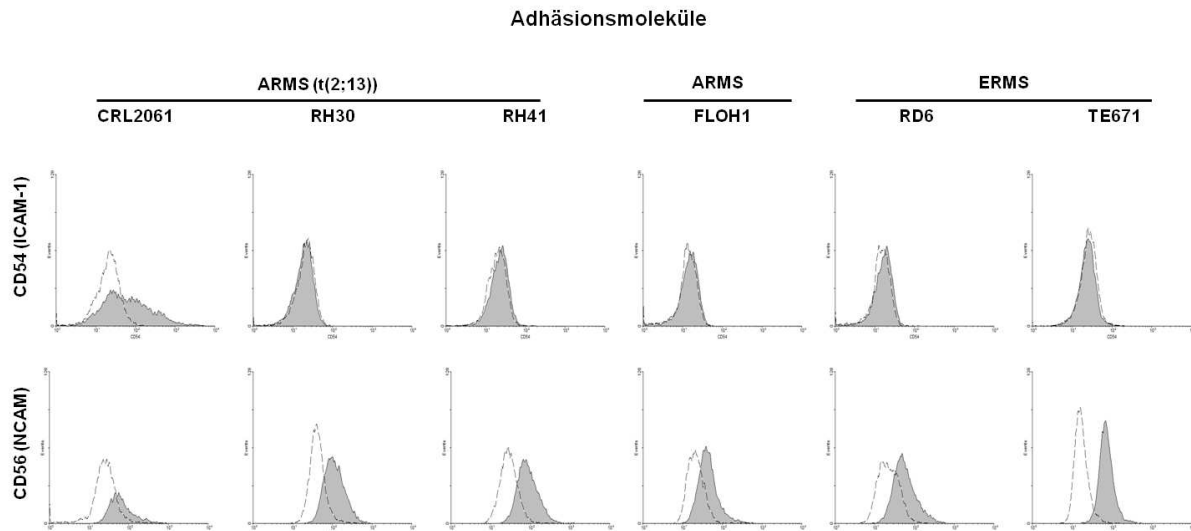


Abbildung 3.17: Durchflusszytometrische Analyse der beiden Adhäsionsmoleküle CD54 (ICAM-1) und CD56 (NCAM) auf der Oberfläche der RMS-Zelllinien; graue Histogramme entsprechen der Proteinexpression, offene gestrichelte Histogramme der Sekundärantikörper-Kontrolle.

Für CD56 wurde auch bei den untersuchten RMS-Biopsien ($n = 10$) eine starke, homogene Färbung ($n = 10$) detektiert (Abbildung 3.18), während die untersuchten Muskelbiopsien nur eine geringe CD56-Expression in denervierten oder beschädigten Muskelfasern aufwiesen. Die erhöhte CD56-Expression wurde auch auf transkriptioneller Ebene beobachtet, war allerdings nur für den ARMS-Subtyp signifikant. Wegen der geringen Zahl verfügbarer ARMS-Biopsien war die Bestätigung dieser Ergebnisse auf Proteinebene schwierig.

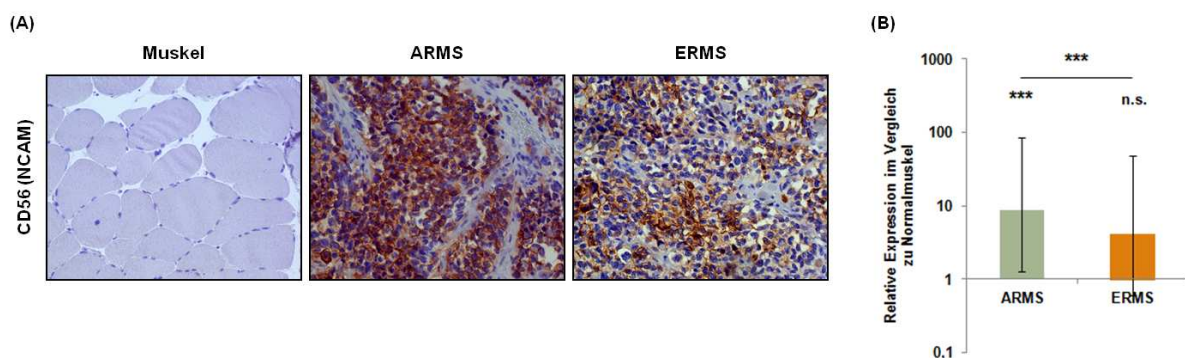


Abbildung 3.18: Expression des Adhäsionsmoleküls CD56 (NCAM) bei RMS. (A) IHC von CD56 an Muskel (negativ), sowie je einem ARMS und einem ERMS (Immunoperoxidase, 200-fache Vergrößerung). (B) qRT-PCR zum Nachweis von CD56 bei ARMS ($n = 10$) und ERMS ($n = 10$) im Vergleich zu gesunder Skelettmuskulatur ($n = 5$) (RQ = 1), als Referenzgen diente GAPDH; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

Die *In-situ*-Expression des Adhäsionsfaktors CD54 war im Vergleich zu der CD56-Expression nur schwach ausgeprägt und wurde lediglich bei drei ERMS-Fällen beobachtet (Abbildung

3.19). Auf transkriptioneller Ebene wiesen die untersuchten RMS-Biopsien (ARMS: $n = 10$; ERMS: $n = 10$) gegenüber normaler Muskulatur allerdings eine CD54-Überexpression auf, wobei für den ARMS-Subtyp höhere Expressionsraten detektiert wurden als für den ERMS-Subtyp. Bei vier ERMS-Biopsien wurde außerdem im Zuge einer Chemokinanalyse (nicht gezeigt) eine quantitative Proteinbestimmung von CD54 durchgeführt, bei der Proteinkonzentrationen von 12 bis 30 $\mu\text{g/ml}$ detektiert wurden. Die Diskrepanz zwischen transkriptioneller Expressionsrate und immunhistochemischem Nachweis von CD54 *in situ* könnte auf die Bildung zweier Proteinvarianten zurückzuführen sein.

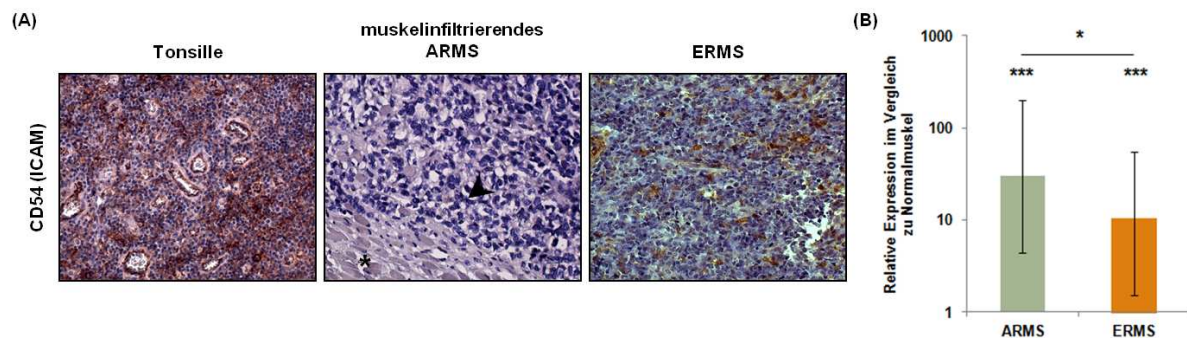


Abbildung 3.19: Expression des Adhäsionsmoleküls CD54 (ICAM-1) bei RMS. (A) IHC von CD54 an Tonsille (Positivkontrolle), sowie je einem ARMS (muskelinfiltrierend) und einem ERMS; * Muskel (querschnitten), der Pfeil weist auf den Tumoranteil hin (Immunperoxidase; 200-fache Vergrößerung). (B) qRT-PCR zum Nachweis von CD54 bei ARMS ($n = 10$) und ERMS ($n = 10$) im Vergleich zu gesunder Skelettmuskulatur ($n = 5$) ($RQ = 1$), als Referenzgen diente GAPDH; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, RQ – relativer Quotient.

Neben der membrangebundenen Variante wurde für CD54 zusätzlich eine lösliche Proteinvariante beschrieben, die anhand der angewendeten Methoden jedoch nicht detektiert werden konnte. Bei einigen Lymphomen und Karzinomen korreliert die verstärkte intra-tumoröse Serumexpression von löslichem CD54 mit einer schlechten Prognose²⁵⁵⁻²⁵⁷. Inwieweit dies für die Prognose bei RMS relevant ist, wurde anhand der Überlebensdaten für die untersuchten ARMS- und ERMS-Biopsien untersucht. Dabei korrelierte die verstärkte CD54-Expression bei ERMS positiv mit dem Überleben ($p = 0,02$) während für ARMS eine negative Tendenz (nicht signifikant) beobachtet wurde.

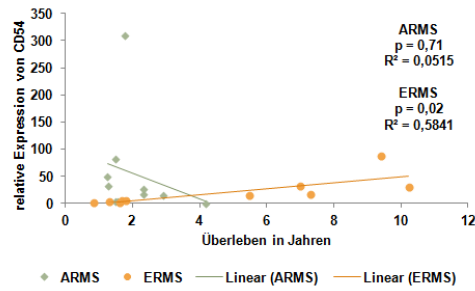


Abbildung 3.20: Zusammenhang zwischen der CD54-Expression und der Überlebenszeit bei ERMS und ARMS; die p-Werte wurden mithilfe der Statistiksoftware SAS berechnet. R^2 - Regressionskoeffizient.

Ob diese Unterschiede zwischen den beiden RMS-Subtypen auf die unterschiedliche Bildung der membrangebundenen CD54-Variante bei ERMS oder der löslichen CD54-Variante bei ARMS zurückzuführen sind, konnte nicht überprüft werden, da uns keine Seren der entsprechenden RMS-Patienten zur Verfügung standen. Ob die membrangebundene Variante von CD54 allerdings die Interaktion von T-Zellen und Tumorzellen unterstützen kann, wurde im Folgenden am Beispiel von CD54⁺ RMS-Zelllinien und chimären T-Zellen bzw. NKT/CIK-Zellen untersucht.

3.4.3.1 Bedeutung der CD54 Expression auf RMS-Zellen für die Lyse durch chimäre T-Zellen

Die Interaktion von zytotoxischen T-Zellen und CD54 exprimierenden Zellen erfolgt über die Integrine CD11a/CD18 (LFA-1), die sowohl von nicht-transduzierten als auch chimären T-Zellen in gleichem Maße exprimiert wurden (Abbildung 3.21).

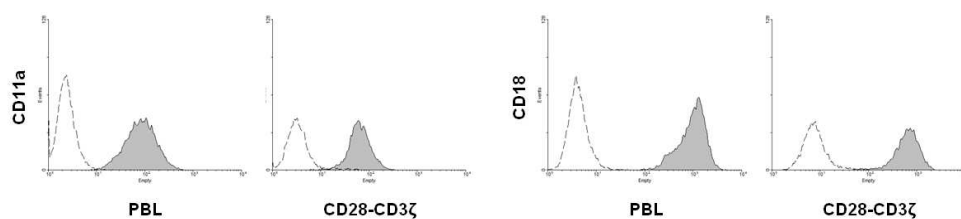


Abbildung 3.21: Durchflusszytometrische Analyse der Expression der Integrine CD11a und CD18 (LFA-1) auf nicht-transduzierten peripheren Blutlymphozyten sowie chimären T-Zellen; graue Histogramme entsprechen der Proteinexpression, offene gestrichelte Histogramme der Sekundärantikörper Kontrolle.

Da mit Ausnahme der ARMS-Zelllinie CRL2061 bei keiner der untersuchten RMS-Zelllinien membrangebundenes CD54 nachgewiesen worden war, wurde dessen Expression über die transiente Transfektion mit einem künstlichen CD54-Konstrukt erzwungen (Abbildung 3.22 (A)).

Wie die MTT-Zytotoxizitätstests nach der Kokultivierung von CD54 neo-exprimierenden RMS-Zellen und chimären T-Zellen zeigen (Abbildung 3.22 (B)), wiesen alle ursprünglich CD54-negativen Zelllinien nach der Transfektion eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber den chimären T-Zellen auf (+10 bis +40%), wobei die Unterschiede bei 4 von 6 Linien signifikant bis hochsignifikant waren. Demgegenüber war die schon primär hohe Empfindlichkeit der natürlicherweise CD54-positiven Zelllinie CRL2061 durch CD54-Hyperexpression nicht weiter zu steigern. Der sensibilisierende Effekt der CD54-Expression wurde mit steigender Relation von chimären T-Zellen zu RMS-Zellen deutlicher. Der größte Effekt (+40%) war bei einem Effektor:Targetzellverhältnis von 2,5:1 bei den besonders resistenten Linien RH30 und TE671 zu beobachten (Abbildung 3.22 (B)).

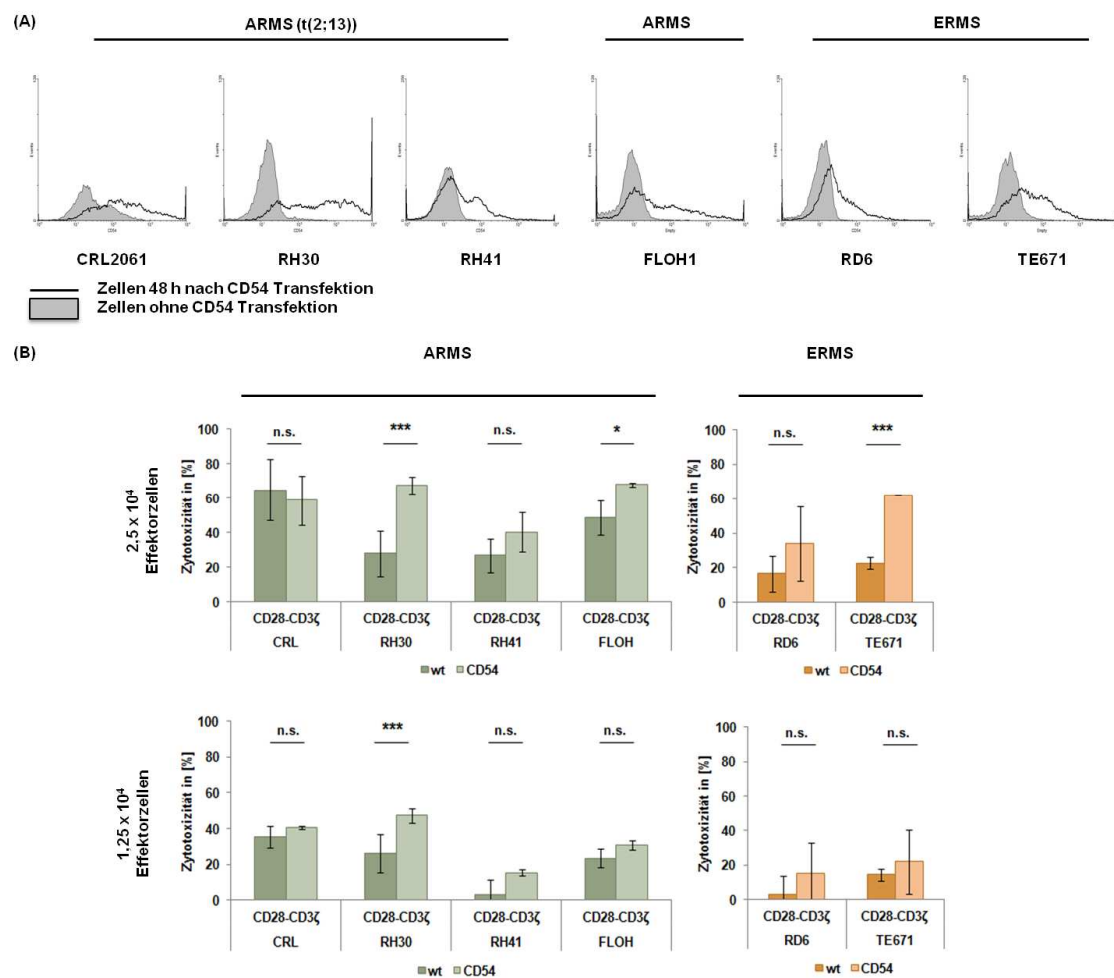


Abbildung 3.22: Transfektionsbedingte Überexpression von CD54 (ICAM-1) durch RMS-Zelllinien und dessen Einfluss auf die Zytotoxizität chimärer T-Zellen. (A) Durchflusszytometrische Analyse der CD54 (ICAM-1)-Expressionsraten 48 h nach Transfektion; grau eingefärbte Histogramme geben die CD54-Expression von wt-Zelllinien wider, offene schwarze Histogramme entsprechen der Expression nach CD54-Transfektion. (B) MTT-Zytotoxizitätstest von CD54-transfizierten (\emptyset) und nicht-transfizierten (wt) RMS-Zelllinien (je 1×10^4 Zellen/well) nach Kokultivierung mit „CD28-CD3 ζ “-chimären T-Zellen (48 h) bei zwei verschiedenen Effektorzellichten; die Zytotoxizität von nicht-modifizierten T-Zellen wurde als 0% angenommen.

3.4.3.2 Interaktion von NKT-Zellen mit CD54 (+) RMS-Zelllinien

Interessant war in dieser Hinsicht auch, ob eine Überexpression des Adhäsionsmoleküls die Wirkung normaler, nicht-transduzierter PBL verändert. Dazu wurden zusätzlich sowohl PBL als auch NKT/CIK-Zellen mit den CD54-transfizierten Zelllinien kokultiviert.

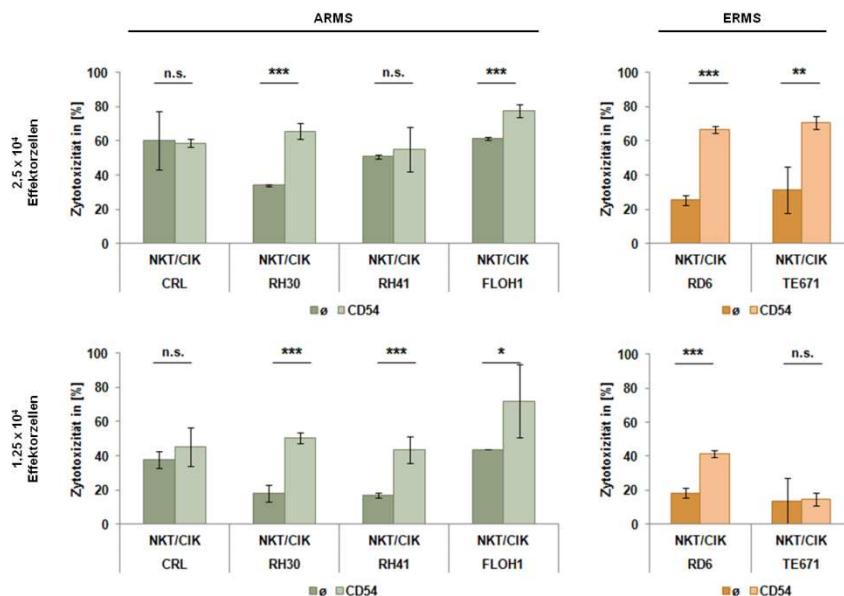


Abbildung 3.23: MTT-Zytotoxizitätstest von nicht-transfizierten (dunkle Farbschattierung) als auch CD54-transfizierten (helle Farbschattierung) RMS-Zelllinien (je 1×10^4 Zellen/well) 48 h nach Kokultivierung mit NKT/CIK-Zellen bei zwei verschiedenen Effektorzellichten. Die Zytotoxizität bei Kultivierung mit nicht modifizierten PBLs wurde als 0% angenommen.

Mit Ausnahme der CD54-exprimierenden ARMS-Zelllinie CRL2061, wurde für alle CD54 *de novo* exprimierenden RMS-Zelllinien eine, den chimären T-Zellen vergleichbare, gesteigerte Zelllyse beobachtet. Bei den ERMS-Zellen war dieser Effekt bei einem Effektor:Targetzellverhältnis von 2,5:1 am größten (+40%), während bei den ARMS-Zelllinien bereits ab einem Effektor:Targetzellverhältnis von 1,25:1 die stärksten Effekte (+30%) erzielt wurden.

3.4.4 Expression inhibitorischer Oberflächenmoleküle bei RMS

Neben den beschriebenen Molekülen mit kostimulierenden und adhäsionsfördernden Effekten sind mittlerweile mehrere inhibitorische Oberflächenmoleküle bekannt, die zu einer Hemmung von Effektor-T-Zellen bei der Interaktion mit den Tumorzellen führen. Dazu zählen unter anderem B7H1 sowie das erst kürzlich entdeckte B7H3²⁵⁸.

Die Expression des inhibitorischen Oberflächenmolekül B7H1 (PD-1L) konnte bei den beiden ARMS-Zelllinien CRL2061 und RH30 sowie den beiden ERMS-Zelllinien RD6 und TE671 in unterschiedlicher Ausprägung beobachtet werden, während das Protein weder bei RH41 noch bei FLOH1 detektiert wurde (Abbildung 3.24).

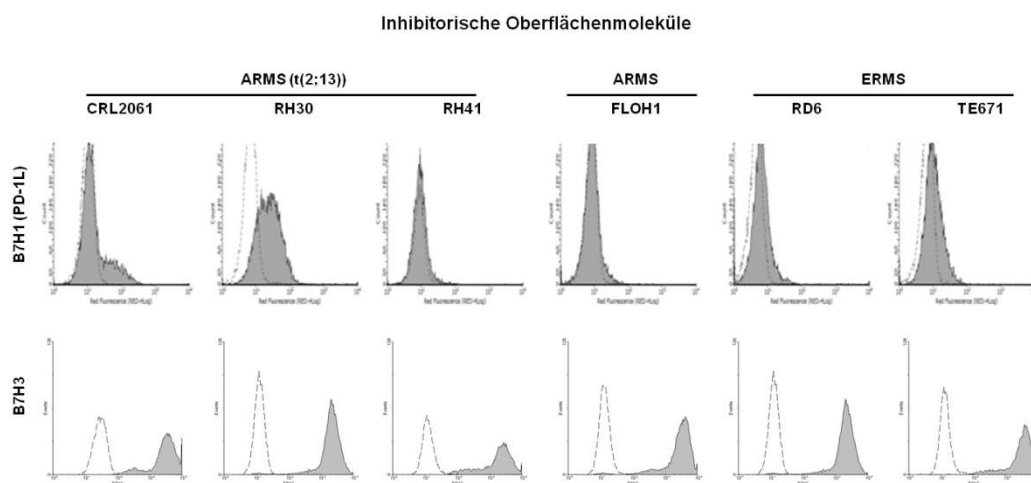


Abbildung 3.24: Durchflusszytometrische Analyse der B7H1 (PD-1L)- und B7H3-Expression auf der Oberfläche von RMS-Zelllinien; graue Histogramme entsprechen der Proteinexpression, offene gestrichelte Histogramme der Sekundärantikörper-Kontrolle.

Alle RMS-Zelllinien wiesen zudem eine starke B7H3-Expression auf, die mutmaßlich einen hemmenden Einfluss auf die Interaktion von T-Zellen und Tumorzellen hat⁶⁶ (Abbildung 3.24).

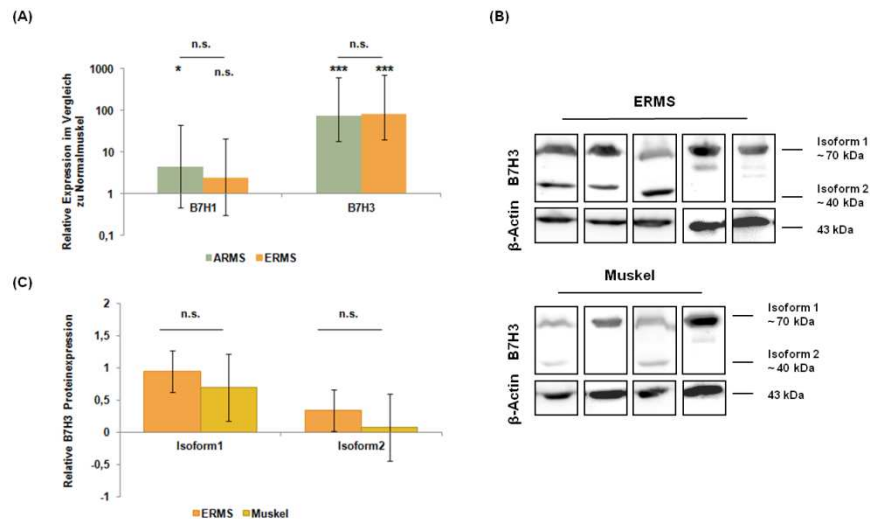


Abbildung 3.25: Expression der inhibitorischen Oberflächenmoleküle B7H1 (PD-1L) und B7H3. (A) qRT-PCR zum Nachweis von B7H1 und B7H3 bei ARMS (n = 10) und ERMS (n = 10) im Vergleich zu gesunder Skelettmuskulatur (n = 5) (RQ = 1), als Referenzgen diente GAPDH; RQ - relativer Quotient. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,005. (B) Western Blot der B7H3-Expression bei ERMS-Frischgewebe (n = 5) im Vergleich zu gesunder Skelettmuskulatur (n = 4), als Ladekontrolle diente β-Aktin. (C) Quantitative Auswertung der B7H3-Proteinexpression des in (B) dargestellten Western Blots.

In situ wiesen die untersuchten ARMS- (n = 10), nicht jedoch die ERMS-Biopsien (n = 10), eine im Vergleich zu Normalmuskel signifikant erhöhte B7H1-Expression auf (Abbildung 3.25). Proteindaten, die den translationalen Status dieses Proteins bei RMS-Biopsien anzeigen, konnten im Verlauf dieser Arbeit nicht gesammelt werden.

B7H1 führt bei PD-1-positiven zytotoxischen Effektorzellen, neben einer verminderten Proliferationsrate zu einer eingeschränkten Zytokinproduktion²⁵⁹ und vermittelt die Anergie der Zellen. Die bei RH30 Zellen detektierte starke B7H1-Expression reduziert mutmaßlich auch die IFN γ -Sekretion der chimären T-Zellen (Abbildung 3.7). In diesem Zusammenhang konnte zudem gezeigt werden, dass chimäre T-Zellen nach Kokultivierung mit RH30 eine, im Vergleich zu den schwach B7H1-exprimierenden Zellen RH41, RD6 und TE671, verminderte Granzym B-Sekretion aufwiesen (Abbildung 3.26).

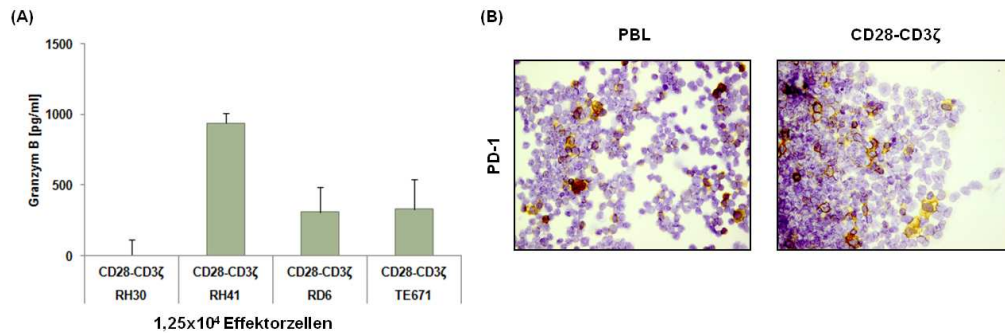


Abbildung 3.26: (A) ELISA der Granzym B-Sekretion von „CD28-CD3 ζ “-chimären T-Zellen ($1,25 \times 10^4$ Zellen/well) nach Kokultivierung mit vier RMS-Zelllinien (1×10^4 Zellen/well) mit unterschiedlicher B7H1-Expression. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikaten und die Standardabweichung der Mittelwerte. Die Werte sind um die Granzym B-Sekretion chimärer T-Zellen ohne die Kokultivierung mit Tumorzellen bereinigt. (B) IHC von PD-1 bei nicht-transduzierten PBL und „CD28-CD3 ζ “-chimären T-Zellen (Immunperoxidase; 200-fache Vergrößerung).

Die quantitative Bestimmung der B7H3-mRNA *in situ* ergab im Vergleich zu Normalmuskel eine signifikante Überexpression bei beiden RMS-Subtypen, die sich untereinander nicht unterschieden. Die B7H3-Proteinexpression wurde zudem anhand von fünf ERMS-Biopsien im Western Blot bestätigt, wobei in drei der fünf ERMS-Biopsien und zwei der vier Muskelbiopsien zwei Proteinbanden detektiert wurden. Dabei handelt es sich mutmaßlich um verschiedene Isoformen des Proteins. Die quantitative Auswertung der Proteinbanden ergab eine tendenziell stärkere Proteinexpression bei RMS-Gewebe, aufgrund hoher Standardabweichungen waren die Unterschiede allerdings nicht signifikant (Abbildung 3.25). Obwohl keine Korrelation zwischen Expressions- und Überlebensdaten bestand (nicht gezeigt), konnte bei Muskelzellen gezeigt werden, dass die Expression von B7H3 einen hemmenden Einfluss auf Immunzellen ausübt⁶⁶. Es war daher die Arbeitshypothese, dass ein „*knock down*“ von B7H3 bei RMS zu einer verbesserten Zelllyse durch chimäre T-Zellen führen könnte.

3.4.4.1 B7H3 knock down

Die „*knock down*“-Experimente wurden am Beispiel der beiden ARMS-Zelllinien CRL2061 (t(2; 13)) und FLOH1 sowie der beiden ERMS-Zelllinien RD6 und TE671 durchgeführt und durchflusszytometrisch überprüft. Zwar führte die Transfektion der Zellen mit B7H3-siRNA zu einer Verminderung der Expressionsrate, eine totale Inhibierung der Proteinexpression war mit dieser Methode allerdings nicht möglich (Abbildung 3.27). Durch den partiellen „*knock down*“ war keine signifikante Verbesserung des zytotoxischen Effektes für CRL2061, FLOH1, RD6 oder TE671 detektierbar.

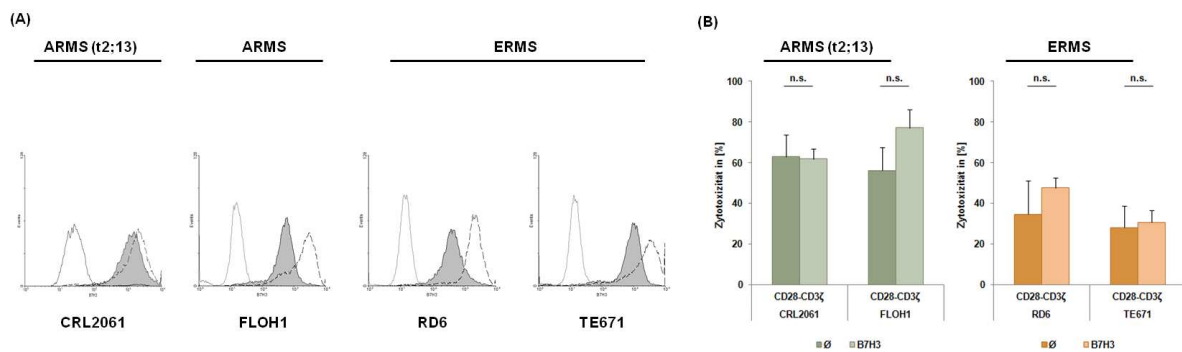


Abbildung 3.27: (A) Durchflusszytometrische Analyse der B7H3-Expression nach einem „knock down“ mit spezifischer siRNA; graue Histogramme entsprechen der B7H3-Expression 48 h nach dem „knock down“, offene gestrichelte Histogramme entsprechen der wildtypischen B7H3-Expression der RMS-Zelllinien, offene graue Histogramme der Sekundärantikörper Kontrolle. (B) MTT-Zytotoxizitätstest von nicht-transfizierten (dunkle Farbschattierung) und mit B7H3-siRNA transfizierten (helle Farbschattierung) RMS-Zelllinien (1×10^4 Zellen/well) nach Kokultivierung (48 h) mit „CD28-CD3 ζ “-chimären T-Zellen; die Zytotoxizität nicht-transduzierter PBL wurde mit 0% angenommen.

3.4.5 Zusammenfassung der bei RMS-Zelllinien und Geweben exprimierten immunologischen Oberflächenmoleküle

Tabelle 3.3 bietet eine Zusammenfassung des Expressionsprofils der untersuchten Oberflächenrezeptoren bei RMS-Zelllinien.

Tabelle 3.3: Durchflusszytometrisch bestimmte Expressionsprofile immunologisch relevanter Oberflächenmoleküle aller verwendeten RMS-Zelllinien.

Oberflächenrezeptor	CRL2061	RH30	RH41	FLOH1	RD6	TE671
MHC-I	-	+++	++	+++	+++	+++
MHC-II	-	-	-	++	-	-
B7.1 (CD80)	-	-	-	-	-	-
B7.2 (CD86)	-	-	-	-	-	-
B7H2 (ICOS-L)	-	+	-	+	+	+
CD54 (ICAM-1)	++	-	-	-	-	-
CD56 (NCAM)	+	++	+	++	++	++
B7H1 (PD-1L)	+	++	-	-	+	+
B7H3	+++	+++	+++	+++	+++	+++

- keine Expression, + schwache Expression, ++ mittelstarke Expression, +++ starke Expression

Dabei fällt auf, dass sich die beiden ERMS-Zelllinien stark ähneln, während die ARMS-Zelllinien – auch jene mit gleicher t(2; 13) Translokation – sehr heterogen erscheinen. Gerade

die ARMS-Zelllinie CRL2061 unterschied sich durch die fehlende MHC-I- und die verstärkte CD54-Expression von den anderen ARMS-Zelllinien, während RH41 bei allen untersuchten Molekülen, mit Ausnahme von B7H3, im Vergleich zu den anderen Linien eine stark verminderte Proteinexpression aufwies. Für die chimäre T-Zelltherapie ist insbesondere die fehlende Expression der Kostimulatoren und die starke Expression von inhibitorischen Oberflächenmolekülen (B7H1 und B7H3) von potenzieller Bedeutung, während die Expression der MHC-Moleküle nur von untergeordneter Relevanz sein dürfte.

Tabelle 3.4: Expression immunologisch relevanter Oberflächenmoleküle bei RMS anhand von Paraffingewebe

<i>Oberflächenrezeptor</i>	<i>B7.1</i>	<i>B7.2</i>	<i>B7H2</i>	<i>CD54</i>	<i>CD56</i>	<i>HLA-G</i>
ERMS (n = 8)	- (8)		- (2)	- (3)	- (0)	
			-/+ (3)	-/+ (3)	+ (2)	-/+ (8)
			++ (1)		++ (3)	
					+++ (2)	
		n.b. (8)	n.b. (2)	n.b. (2)	n.b. (2)	
ARMS (n = 2)	- (2)		+ / ++ (2)	- (1)	+++ (1)	- / + (2)
		n.b. (2)		n.b. (1)	n.b. (1)	
Muskel (n = 5)	- (5)	n.b. (5)	- (5)	- (5)	- (5)	+++ (5)

- keine Expression, + schwache Expression, ++ mittelstarke Expression, +++ starke Expression, n.b. – nicht bestimmt

Bedingt durch die geringe Anzahl an zur Verfügung stehenden Biopsien ließ sich *in situ* kein ERMS- oder ARMS-spezifisches Expressionsmuster von kostimulatorischen oder koinhibitorischen Oberflächenmolekülen nachweisen. Die vorangegangenen Kapitel deuten allerdings darauf hin, dass die verwendeten Zelllinien das Expressionsprofil der RMS-Gewebe wiedergeben und somit eine gute Basis für weitere *In-vitro*-Versuche sind.

3.5 Einfluss von IFN γ auf RMS-Zelllinien

Von einigen der oben betrachteten Oberflächenmoleküle ist bekannt, dass ihre Expression durch die Bereitstellung immun-modulatorischer Zytokine, wie IFN γ oder TNF α , verändert wird. Die mögliche Expressionssteigerung des Target-Antigens (fAChR) oder kostimulatorischer Moleküle kann für eine chimäre T-Zelltherapie von Vorteil sein, während bei einer verstärkten Expression inhibitorischer Oberflächenmoleküle nachteilige Effekte zu erwarten sind. In einer früheren Arbeit über die Wirkung chimärer T-Zellen auf RMS wurde zudem die Hypothese geäußert, dass die Apoptose der RMS-Zelllinien durch die hohen lokalen IFN γ -Spiegel bedingt sein könnte, die nach Erkennung und Bindung des Target-Antigens durch

die zytotoxischen T-Zellen zu beobachten sind²²³. Das Folgende Kapitel beschäftigt sich mit den Auswirkungen von $\text{IFN}\gamma$ und teilweise auch $\text{TNF}\alpha$ auf die Expression diverser, funktionell relevanter Oberflächenmoleküle von RMS-Zellen sowie deren Bedeutung für die Induktion der Apoptose.

3.5.1 $\text{IFN}\gamma$ -„response“-Gene

Bei RMS-ähnlichen Myoidzellen aus dem Thymus wurde gezeigt, dass die Expression aller AChR-Untereinheiten durch $\text{IFN}\gamma$ gesteigert werden kann²⁶⁰. Demzufolge könnte die Stimulation von RMS-Zellen mit $\text{IFN}\gamma$ über den „Umweg“ einer Überexpression des fAChR zu einer besseren Erkennung durch die Effektorzellen und dadurch zu einer verbesserten Zelllyse führen. Diese Hypothese wurde in den nachfolgenden Experimenten überprüft. Als Kontrolle für die $\text{IFN}\gamma$ -Wirkung wurde die Expression der beiden klassischen $\text{IFN}\gamma$ -„response“-Gene MHC-I und MHC-II nach $\text{IFN}\gamma$ -Inkubation betrachtet.

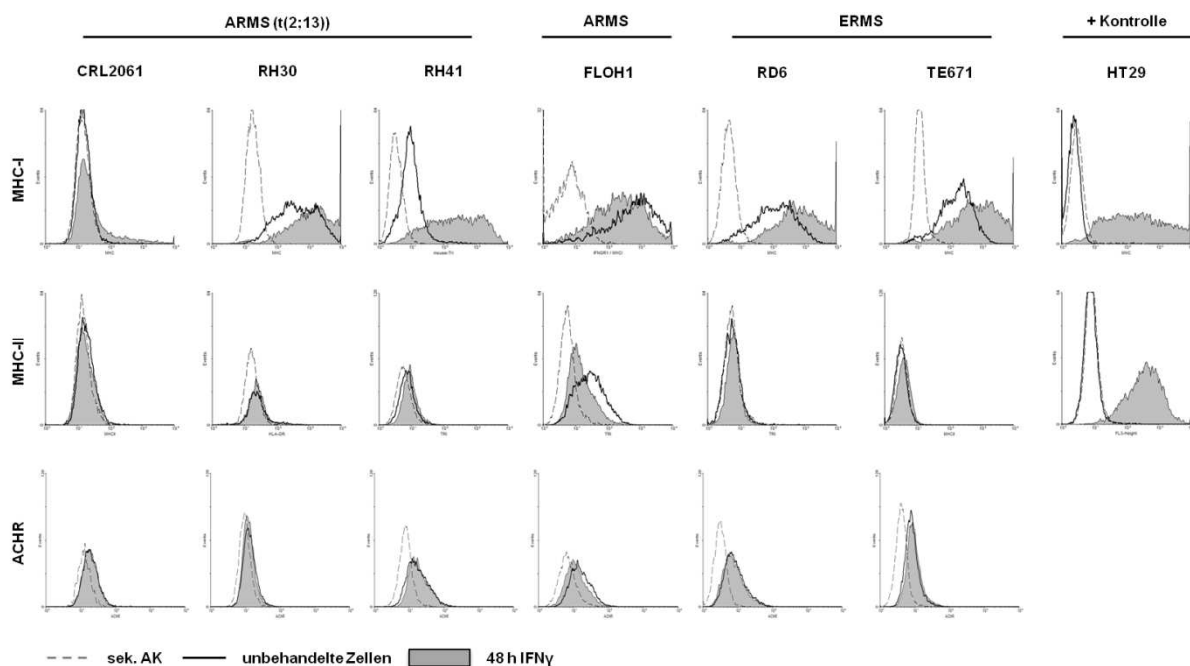


Abbildung 3.28: Durchflusszytometrische Analyse von fAChR, MHC-I und MHC-II 48 h nach Inkubation mit $\text{IFN}\gamma$ in Hungermedium (1% FBS); gefüllte Histogramme entsprechen der Expression des jeweiligen Proteins nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation, offene Histogramme entsprechen der Expression ohne $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation, gestrichelte offene Histogramm entsprechen der Sekundärantikörper-Kontrolle.

Vergleicht man die MHC-I-Expression der $\text{IFN}\gamma$ -sensitiven Colonkarzinom-Zelllinie HT29 mit den RMS-Zelllinien fällt auf, dass eine Expressionssteigerung lediglich bei der ARMS-Zelllinie RH41 in signifikantem Ausmaß erfolgte. Dahingegen war die Expressionssteigerung bei den

beiden ERMS-Zelllinien RD6 und TE671 nur mäßig, während die ARMS-Linien CRL2061, RH30 und FLOH1 gar nicht auf die Behandlung mit $\text{IFN}\gamma$ ansprachen. Weiterhin wurde bei keiner der RMS-Zelllinien eine Induktion der MHC-II-Expression oder fAChR-Expression detektiert (Abbildung 3.28).

Diese Beobachtung wurde auch für andere im Verlauf der Arbeit untersuchten Gene gemacht. Zusätzlich wurde hierbei auch der Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ untersucht. Außer bei der ARMS-Zelllinie RH41, deren B7H1-Expression durch $\text{IFN}\gamma$ und deren B7H2-Expression in geringem Maße durch $\text{TNF}\alpha$ beeinflusst wurde, konnte bei den RMS-Zelllinien keine Veränderungen der Genexpression nach Zytokingabe beobachtet werden (Abbildung 3.29 zeigt exemplarisch drei der sechs RMS-Zelllinien).

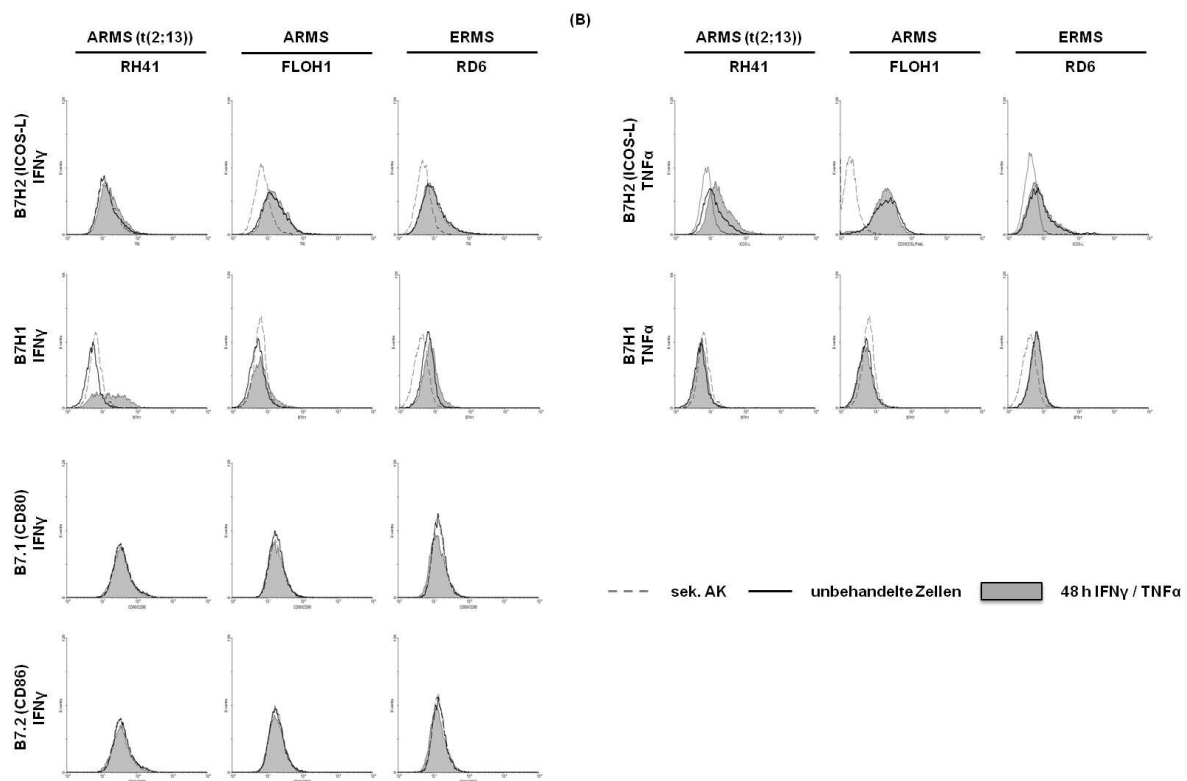


Abbildung 3.29: Durchflusszytometrische Analyse der Expression verschiedener $\text{IFN}\gamma$ -„response“-Gene nach Inkubation mit 100 ng/ml $\text{IFN}\gamma$ oder 50 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ über einen Zeitraum von 48 h. Die Inkubation erfolgte in Hungermedium mit 1% FBS; gefüllte Histogramme entsprechen der Proteinexpression nach $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ -Stimulation, offene Histogramme entsprechen der Expression ohne $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ -Stimulation, offene gestrichelte Histogramme entsprechen der Sekundärantikörper-Kontrolle.

3.5.2 IFN γ -abhängige Apoptose-Stimulation bei RMS-Zelllinien

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass RMS-Zelllinien offensichtlich schlecht auf eine Stimulation mit IFN γ ansprechen. Im Folgenden wurde die in Vorarbeiten aufgestellte Hypothese überprüft, dass chimäre T-Zellen durch die IFN γ Ausschüttung nach Erkennung und Bindung des Target-Antigens, die Apoptose bei den RMS-Zellen induzieren²²³.

Entgegen der zuvor geäußerten Vermutung, führte die Behandlung mit IFN γ über einen Zeitraum von 96 h bei den Zelllinien FLOH1, RD6 und TE671 weder zu einer Apoptose-Induktion, noch zu einer Beeinträchtigung der Proliferation. Bei den beiden translokations-positiven ARMS-Zelllinien CRL2061 und RH41 wurde durch die Zugabe von IFN γ lediglich ein Zellzyklusarrest induziert, während RH30 als einzige untersuchte RMS-Zelllinie nach 72 h eine Verminderung lebender Zellen aufwies (Abbildung 3.30 (A)). Im Gegensatz dazu zeigte die IFN γ -sensitive Zelllinie HT29 bereits nach 24 h eine verminderte Proliferationsrate und eine Abnahme stoffwechselaktiver Zellen nach 48 h (Abbildung 3.30 (B)).

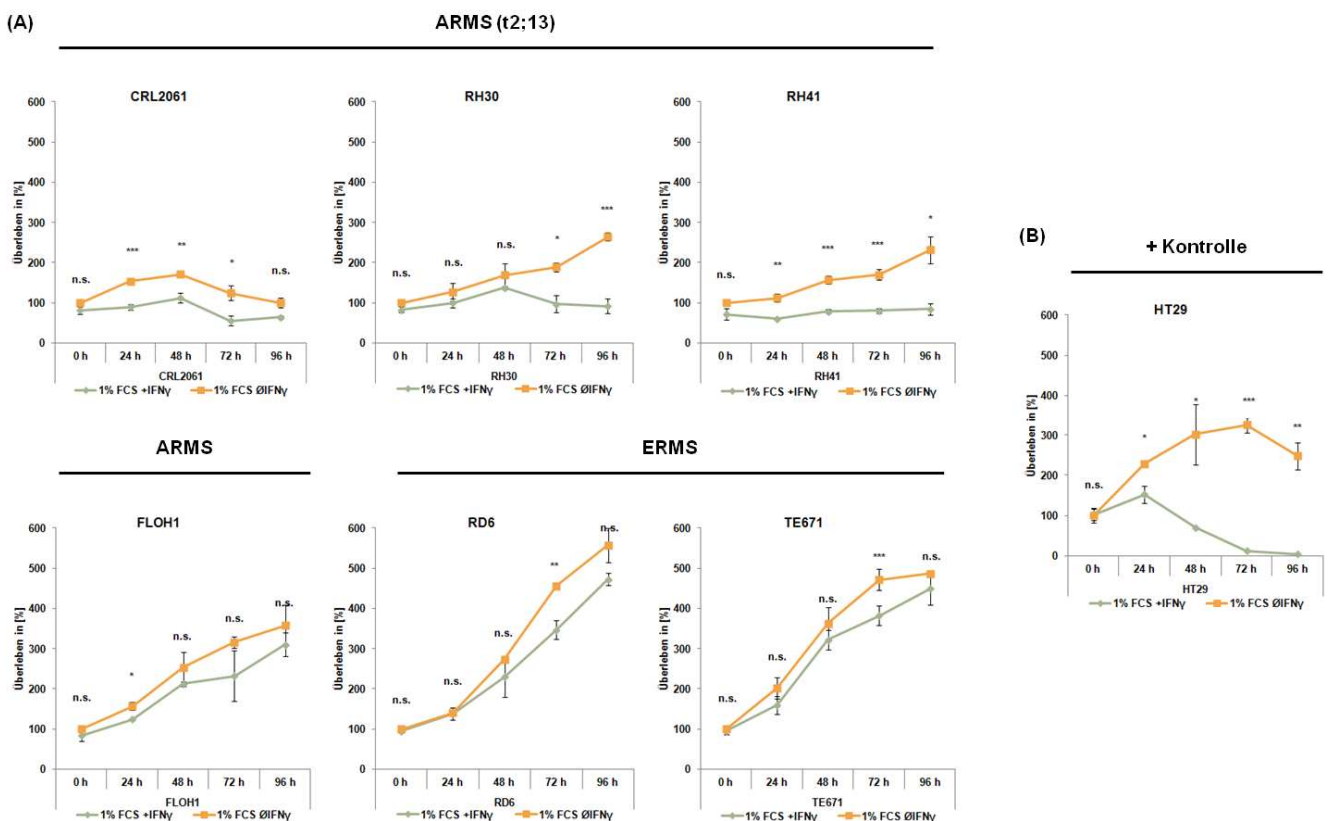


Abbildung 3.30: MTT-Test zur Darstellung der Überlebensrate von RMS-Zelllinien (A) und der IFN γ -sensitiven Zelllinie HT29 (B) mit und ohne IFN γ -Behandlung. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert aus Triplikaten sowie der Standardfehler des Mittelwertes. Der Anteil stoffwechselaktiver Zellen in (%) bezieht sich auf nicht behandelte Zellen zum Zeitpunkt 0 h.

Die im MTT-Test erhaltenen Ergebnisse wurden anhand einer Annexin V/PI-Doppelfärbung bei den Zelllinien RH30, FLOH1 und TE671 ebenso wie der Kontroll-Zelllinie HT29 überprüft. Die $\text{IFN}\gamma$ -Behandlung führte bei den HT29-Zellen zeitabhängig zu einer kontinuierlichen Zunahme doppelt-positiver Zellen, die einen späten apoptotischen bzw. nekrotischen Phänotyp repräsentieren. Demgegenüber war bei den beiden untersuchten RMS-Zelllinien FLOH1 und TE671, passend zu den funktionellen Analysen, über den gesamten Zeitraum keine Zunahme Annexin V/PI-positiver Zellen zu verzeichnen, während bei den $\text{IFN}\gamma$ -sensitiven RH30-Zellen (s. oben) der Anteil doppelt-positiver Zellen nach 96 h bei 60% lag (Abbildung 3.31 A).

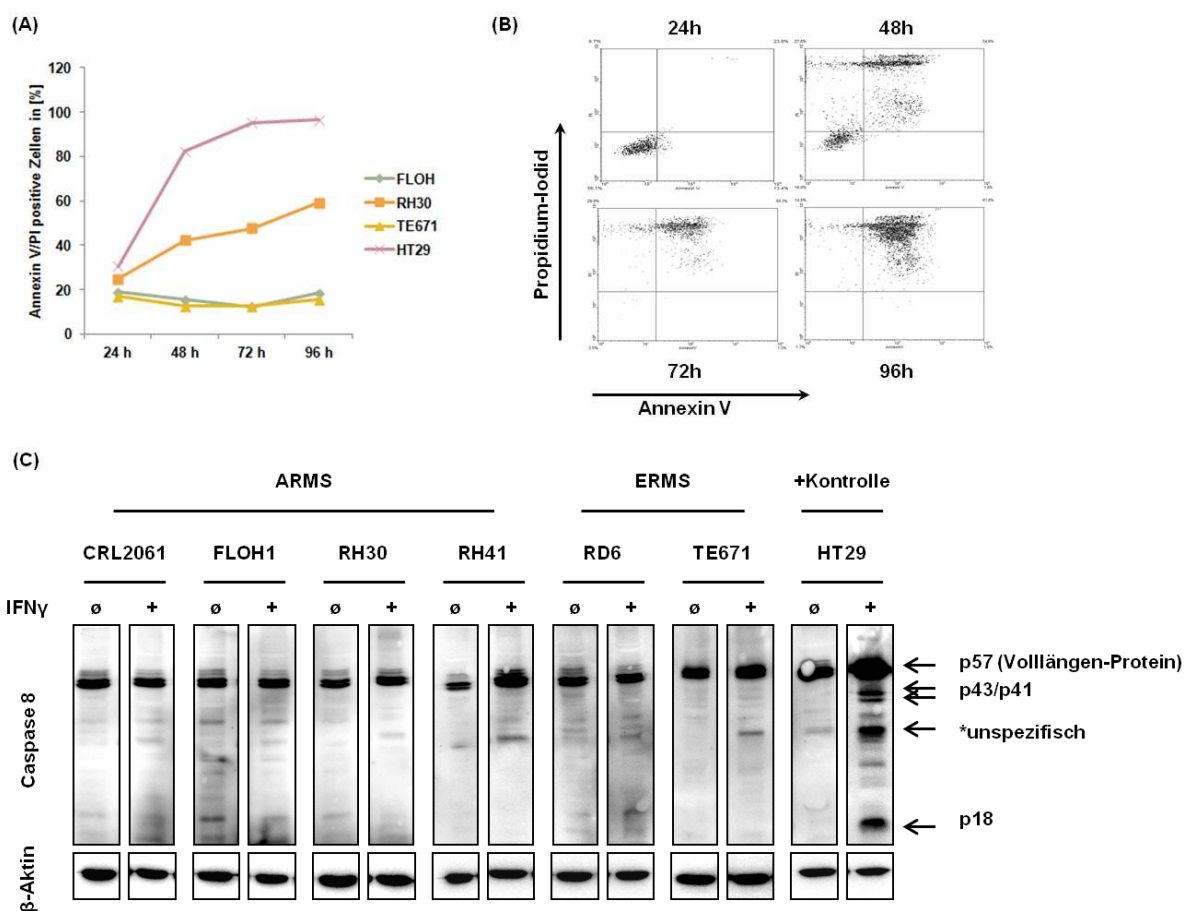


Abbildung 3.31: (A) Durchflusszytometrische Analyse von $\text{IFN}\gamma$ -behandelten Zellen nach Annexin V/PI-Färbung. Dargestellt ist der Anteil der PI-positiven Zellen abhängig von der Zeit. (B) „Dot Blot“ einer Annexin V/PI-Doppelfärbung bei $\text{IFN}\gamma$ -behandelten HT29 Zellen nach 24, 48, 72 und 96 h. (C) Western Blot der Caspase 8-Spaltung bei den untersuchten RMS-Zelllinien sowie der Kontroll-Zelllinie HT29 24 h nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation. Nachweisbar waren das Volllängen-Protein p57 sowie die Caspase 8-Fragmente p43/41 und p18. β -Aktin diente als Ladekontrolle. PI – Propidiumiodid.

Die IFN γ -vermittelte Apoptose-Induktion bei der Colonkarzinom-Zelllinie HT29 wird über die Spaltung der Procaspasen 3, 7, 8 und 9 vermittelt²⁶¹. In der vorliegenden Arbeit wurde die Apoptose-Induktion anhand der Caspase 8-Spaltung bestätigt. Die Spaltprodukte P43/P41 und P18 wurden allerdings bei keiner der untersuchten RMS-Zelllinien detektiert, inklusive der ARMS-Zelllinie RH30 (Abbildung 3.31).

3.5.3 Der IFN γ -Signaltransduktionsweg bei RMS

Aufgrund der Resistenz von RMS-Zelllinien gegenüber einer IFN γ -vermittelten Apoptose wurde IFN γ als auslösender Faktor für eine durch chimäre T-Zellen vermittelte Zytotoxizität ausgeschlossen. Da zusätzlich ein Ansprechen diverser IFN γ -„response“-Gene auf die Zytokinbehandlung ausbleibt und die Resistenz von Tumorzellen gegenüber IFN γ eine Rolle bei der Tumorentstehung spielt⁶², wurde im Weiteren die Funktionalität des IFN γ -Signaltransduktionsweges bei RMS-Zellen untersucht. Zunächst wurde dazu die Expression der beiden IFN γ -Rezeptoren IFNGR1 und 2 kontrolliert, wobei besonders IFNGR2 als limitierender Faktor im IFN γ -Signalweg gilt²⁶².

Tatsächlich wurde IFNGR2 im Gegensatz zu IFNGR1 von den RMS-Zelllinien nur schwach exprimiert. Das Expressionsniveau entsprach allerdings in beiden Fällen demjenigen der IFN γ -sensitiven Kontroll-Zelllinie HT29 (Abbildung 3.32). Die Langzeitinkubation mit IFN γ führte zudem zu einer physiologische Abnahme von IFNGR1, von der bekannt ist, dass sie auf einem Rezeptor-Recycling beruht²⁶³ (nicht gezeigt).

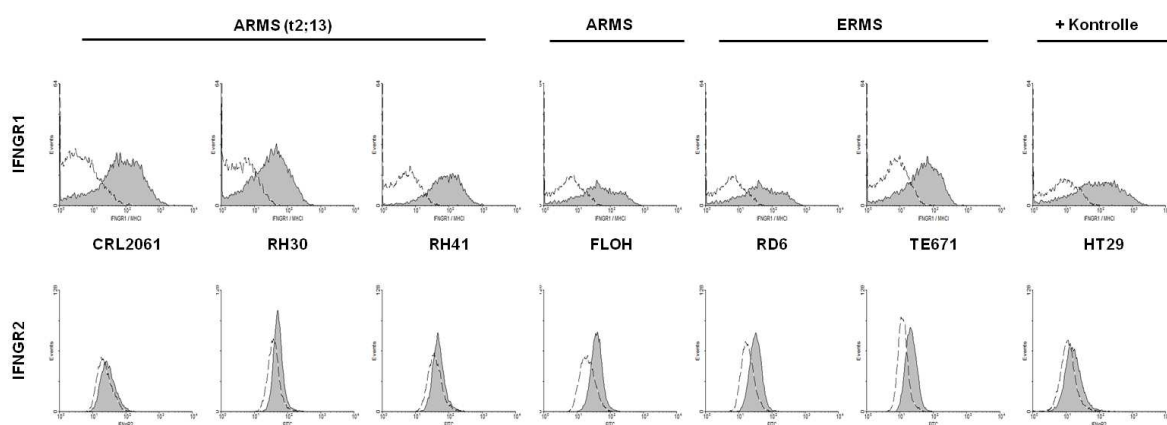


Abbildung 3.32: Durchflusszytometrische Analyse der IFNGR1- und IFNGR2-Expression auf translokations-positiven (t(2;13)) und einer translokations-negativen ARMS sowie zwei ERMS-Zelllinien; gefüllte Histogramme entsprechen der Expression der IFNGR1 (oben) bzw. 2 (unten), offene gestrichelte Histogramme entsprechen der Sekundärantikörper-Kontrolle.

Mutationen, welche die für die Funktionalität der IFNGR1-Signaltransduktion essentielle STAT1-Phosphorylierungsstelle YDKPH (Y₄₄₀) bzw. das JAK-Bindemotiv LPKS betreffen²⁶⁴, konnten durch Sequenzierung ausgeschlossen werden (nicht gezeigt).

Der nächste wichtige Schritt im IFN γ -Signaltransduktionsweg ist die Phosphorylierung von STAT-1, das im Zellkern die Induktion von IFN γ -„response“-Genen vermittelt. Die Phosphorylierung dieses Transkriptionsfaktors wurde bei allen RMS-Zelllinien detektiert, die in jedem Fall nicht schwächer als die der IFN γ -sensitiven HT29 Zelllinie war (Abbildung 3.33).

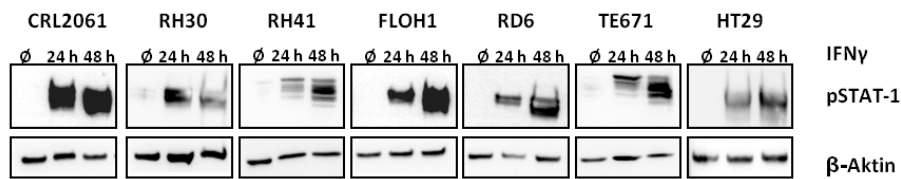


Abbildung 3.33: Western Blot Analyse der Phosphorylierung von STAT-1 bei RMS-Zelllinien und HT29 Kontroll-Zellen ohne Stimulation und 24 h bzw. 48 h nach Stimulation mit 100 ng/ml IFN γ . Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

3.5.4 Regulierung von IFN γ -Target-Genen auf transkriptioneller Ebene

Um zwischen einer transkriptionellen und posttranskriptionellen Regulationsstörung des IFN γ -Signalwegs in RMS-Zellen unterscheiden zu können, wurde die Expression von MHC-I, MHC-II sowie der α - und γ -UE des AChR mittels quantitativer „real time“-PCR (qRT-PCR) in IFN γ behandelten (48 h) und unbehandelten Zellen vergleichend untersucht.

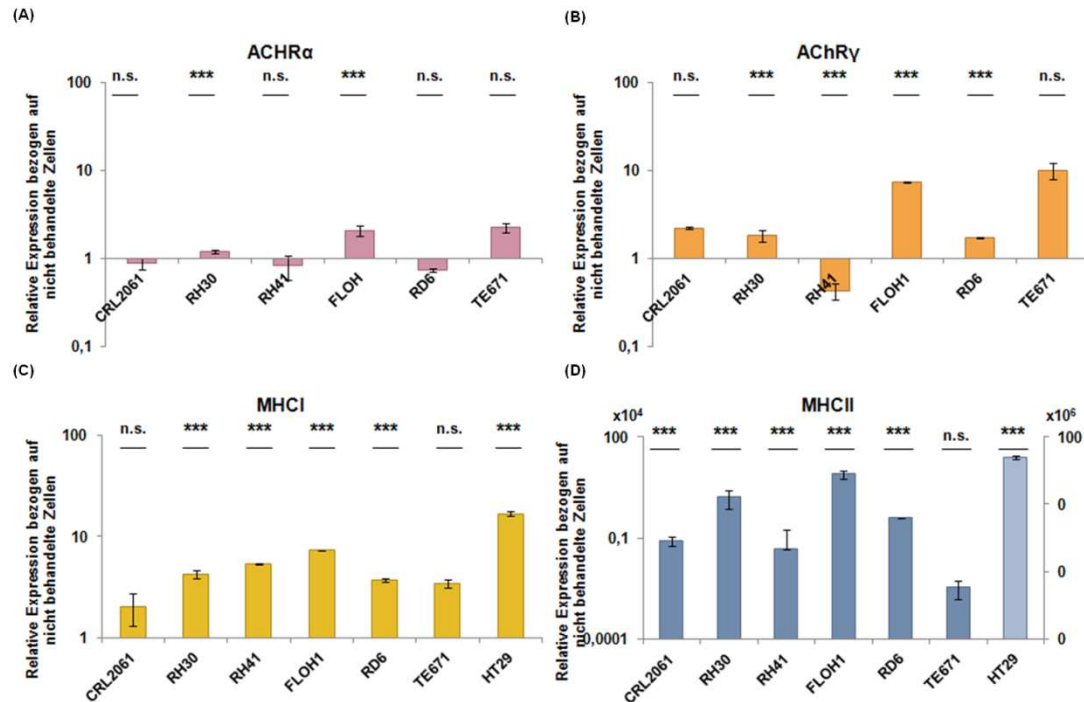


Abbildung 3.34: Quantitative Bestimmung der Expression von AChRα- (A) und AChRγ-mRNA (B) in RMS-Zellen sowie von MHC-I- (C) und MHC-II-mRNA (D) in RMS und HT29 Kontroll-Zellen mittels qRT-PCR 48 h nach IFNγ-Behandlung (100 ng/ml IFNγ). Die Expression wurde auf GAPDH normalisiert und mit nicht behandelten Zellen verglichen (RQ = 1); * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,005, RQ – relativer Quotient.

Für die beiden untersuchten UE des AChR konnte lediglich bei RH30, FLOH1 und im Falle der γ-UE auch für RD6 eine signifikante Expressionsteigerung nachgewiesen werden. Demgegenüber war für MHC-I und MHC-II in allen RMS-Zelllinien eine signifikante IFNγ-abhängig Steigerung der Expression detektierbar, die aber im Vergleich zu der IFNγ-sensitiven Positivkontrolle, d.h. HT29-Zellen, gering war: die Steigerung war bei RMS-Zellen im Falle der MHC-I-Expression um den Faktor 3, im Falle der MHC-II-Expression im Durchschnitt sogar um den Faktor 2×10^4 niedriger als in HT29-Zellen (Abbildung 3.34).

3.5.5 SOCS-1

Ein weiteres zentrales regulatorisches Molekül für den IFNγ-Signalweg ist der *Suppressor of Cytokine Signaling* (SOCS-1). SOCS-1 wirkt als STAT-1 induzierbarer STAT-1-Inhibitor und kann somit den IFNγ-Signaltransduktionsweg unterbrechen.

Bei der Kontrolle der SOCS-1-Expression wurde in den RMS-Zelllinien eine um den Faktor 7 höhere spontane SOCS-1-Expression gefunden als in den IFNγ-sensitiven HT29-Zellen (Abbildung 3.35 (A)). Die Induzierbarkeit von SOCS-1 durch IFNγ war in RMS-Zellen zwar vorhanden (Abbildung 3.35 (C)), jedoch in wesentlich geringerem Maße als bei der

Kontrollzelllinie HT29 (Abbildung 3.35 (B)): die SOCS-1 RNA nahm in RMS-Zelllinien nur um den Faktor 3 zu, während in IFN γ -behandelten HT29-Zellen gegenüber unbehandelten Zellen eine Steigerung um den Faktor 200 stattfand (Abbildung 3.35 (D)).

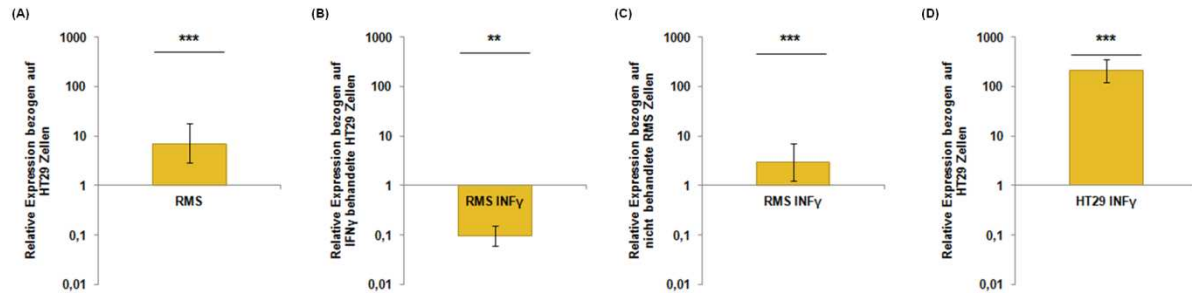


Abbildung 3.35: Quantitative Bestimmung der Expression von SOCS-1 mRNA in RMS-Zellen und HT29-Kontroll-Zellen mittels qRT-PCR. Die Expression wurde jeweils auf GAPDH normalisiert. (A) Vergleich von unbehandelten RMS-Zellen mit unbehandelten HT29-Kontroll-Zellen (RQ = 1). (B) Vergleich von IFN γ -behandelten RMS-Zellen mit IFN γ -behandelten HT29-Zellen (RQ = 1). (C) Vergleich von IFN γ -behandelten RMS-Zellen mit nicht behandelten RMS-Zellen (RQ = 1). (D) Vergleich von IFN γ -behandelten HT29 mit nicht behandelten HT29-Zellen (RQ = 1); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, RQ – relativer Quotient.

3.5.6 Epigenetische Mechanismen

Da epigenetische Modifikationen wie die Methylierung von Promotorregionen eine verminderte Genexpression von Target-Genen bewirken können, wurde die Methylierung der oben untersuchten IFN γ -„response“-Gene durch die Behandlung der RMS-Zelllinien mit demethylierendem 5-Aza-2'-deoxycytidin (5' Aza) untersucht.

Die Vorbehandlung der RMS-Zelllinien mit 5' Aza über einen Zeitraum von 72 h und die anschließende Inkubation mit IFN γ über weitere 48 h konnte die Genexpression weder beim fAChR noch bei MHC-II induzieren. Im Gegenteil bewirkte die Gabe von 5' Aza sogar eine verminderte MHC-II-Expression bei FLOH1 (Abbildung 3.36 (A)) und eine eingeschränkte

MHC-II-Induktion bei HT29 Zellen (Abbildung 3.36 (A) und Abbildung 3.28).

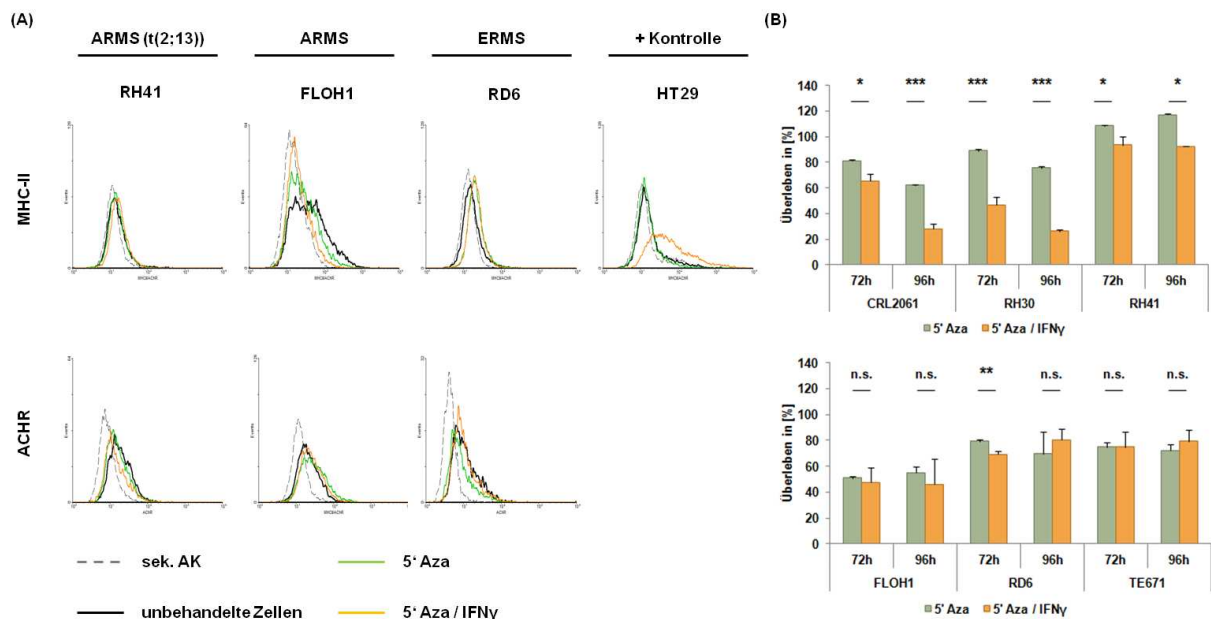


Abbildung 3.36: (A) Regulation der MHC-II und fAChR-Genexpression nach der Behandlung der Zellen mit 5' Aza und IFN γ . Die Abbildung zeigt exemplarisch die durchflusszytometrischen Analysen von drei der sechs RMS-Zelllinien sowie der Kontroll-Zelllinie HT29; offene gestrichelte Histogramme entsprechen der Sekundärantikörper-Kontrolle, schwarze offene Histogramme unbehandelten Zellen, grüne offene Histogramme 5' Aza-behandelten Zellen und orangene offene Histogramme 5' Aza/IFN γ -behandelten Zellen. (B) MTT-Test zur Bestimmung der Überlebensrate von RMS-Zelllinien nach 5' Aza Behandlung mit und ohne IFN γ über einen Zeitraum von 72 h und 96 h. Dargestellt sind jeweils die stoffwechselaktiven Zellen in (%) bezogen auf 5' Aza-behandelte Zellen zum Zeitpunkt 0 h. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

Die Inkubation von RMS-Zelllinien mit 5' Aza und IFN γ über einen Zeitraum von 96 h erhöhte weder bei den beiden ERMS-Zelllinien RD6 und TE671 noch bei der translokations-negative ARMS-Zelllinie FLOH1 die Sensitivität gegenüber IFN γ . Die ARMS-Zelllinien CRL2061 und RH30 wiesen verminderte Überlebensrate auf ($p < 0,005$), die bei der ARMS-Linie RH41 marginal ausfiel ($p < 0,05$). Da RH30-Zellen allerdings auch ohne die Behandlung mit 5' Aza auf IFN γ vermindertes Überleben zeigen (Abbildung 3.30), ließ sich lediglich für CRL2061-Zellen ein signifikant besseres Ansprechen auf IFN γ nach der Inkubation mit 5' Aza erreichen (Abbildung 3.36).

3.6 Apoptose-Mechanismen bei RMS

Aufgrund der stark gehemmten IFN γ -induzierten Apoptose bei RMS-Zelllinien im Vergleich zu HT29-Zellen und des relativ schlechten Ansprechens der RMS-Zellen auf die chimären fAChR-spezifischen T-Zellen, wurden im Folgenden weitere Signaltransduktionswege mit

Relevanz für die Apoptose analysiert. Von besonderem Interesse erschien primär die durch die Todesrezeptoren FAS-L und TRAIL-induzierbare Apoptose, da Verträglichkeit und Wirksamkeit von TRAIL bei der Behandlung von Tumoren in klinischen Phase I/II-Studien gegenwärtig überprüft werden²⁶⁵. Später wurden auch Mechanismen des mitochondrialen Apoptosewegs analysiert.

3.6.1 Extrinsische Apoptoseregulation bei RMS-Zelllinien

TRAIL: Die untersuchten RMS-Zelllinien unterschieden sich stark hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber TRAIL (Abbildung 3.37). Während die ARMS-Zelllinien CRL2061, RH30 und FLOH1 ab einer TRAIL-Konzentration von 5 ng/ml signifikant verminderte Überlebensraten aufwiesen, sprachen die RH41-Zellen erst ab einer Konzentration von 10 ng/ml auf die Behandlung an. Die ERMS-Zelllinien RD6 und TE671 wurden dagegen kaum (10 ng/ml RD6) bzw. gar nicht beeinflusst (Abbildung 3.37 (A)).

Die Ergebnisse wurden mittels einer Annexin V/PI-Färbung für die sensitiven Zelllinien bestätigt, die über einen Zeitraum von 24 h eine Zunahme doppelt-positiver Zellen aufwiesen (Abbildung 3.37 (B) zeigt exemplarisch die Zelllinie FLOH1). Dahingegen veränderte sich der Anteil apoptotisch/nekrotischer Zellen bei der resistenten RMS-Zelllinie TE671 kaum (Abbildung 3.37 (B)). Dass es sich bei den doppelt-positiven Zellen um apoptotische Zellen handelte, belegte der Nachweis von Caspase 8-Spaltprodukten (Abbildung 3.37 (C)). Entgegen den Erwartungen wurde allerdings auch für TE671 eine Spaltung der Procaspase 8 detektiert, wobei im Vergleich zu den sensitiven Zelllinien der Anteil des Volllängenproteins höher war (Abbildung 3.37 (D)).

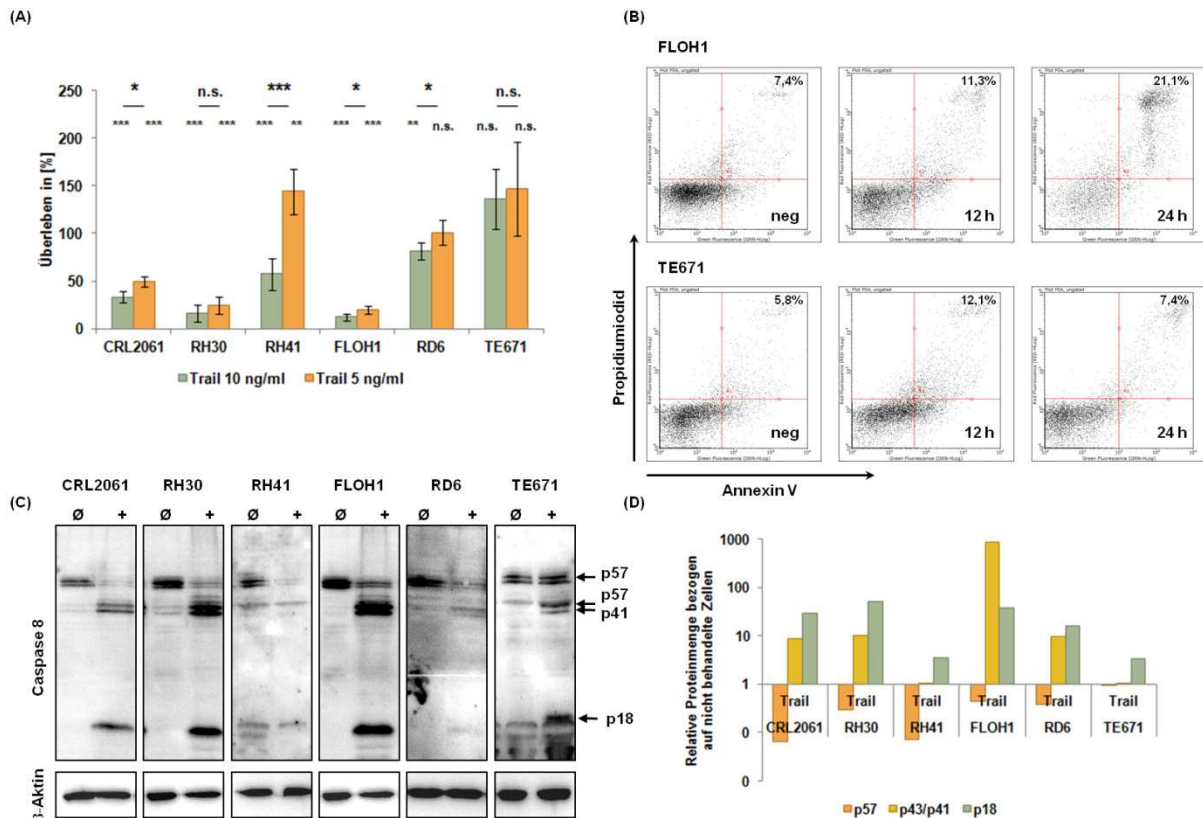


Abbildung 3.37: Einfluss von TRAIL auf das Überleben von RMS-Zelllinien. (A) Überlebensraten von RMS-Zelllinien nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen TRAIL (10 ng/ml bzw. 5 ng/ml) über einen Zeitraum von 48 h in Medium mit 1% FBS. Die Überlebensrate nicht behandelter Zellen (nach 48 h) wurde als 100% angenommen. Gezeigt sind die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen aus vier unabhängigen Versuchen. (B) „Dot Blot“ einer Annexin V/PI-Färbung Doppelfärbung bei TRAIL (5 ng/ml) behandelten FLOH1 und TE671 Zellen nach 12 und 24 h Inkubationszeit. (C) Western Blot der Caspase 8-Spaltung nach 24 h TRAIL-Stimulation (10 ng/ml) bei RMS-Zelllinien. Nachweisbar waren das Volllängen-Protein p57 sowie die Caspase 8-Fragmente p43/41 und p18; β -Aktin diente als Ladekontrolle. (D) Quantitative Auswertung des Caspase-8 Western Blots aus (C). Dargestellt sind die auf die Negativkontrollen abgeglichenen relativen Bandenintensitäten nach TRAIL-Behandlung; PI – Propidiumiodid.

FAS-L: Im Gegensatz zu TRAIL führte die Behandlung der RMS-Zelllinien, auch mit der 50-fachen Menge der vom Hersteller empfohlenen Dosis (ED_{50} Konzentration: 1 ng/ml) lediglich zu geringen (bei CRL2061 und FLOH1) bzw. keinerlei Wachstumseinschränkungen. Für TE671 wurde sogar eine verstärkte Proliferationsrate detektiert. Dahingegen wurden bei der Ewing-Sarkom-Zelllinie RH1 bereits ab einer Konzentration von 5 ng/ml antiproliferative Effekte beobachtet (Abbildung 3.38 (A)). Gleichzeitig führte die Inkubation mit FAS-L bei keiner der RMS-Zelllinien zu einer Zunahme Annexin V/PI-positiver Zellen, während RH1 einen massiven Zuwachs doppelt-positiver Zellen aufwies (Abbildung 3.38 (C) zeigt exemplarisch zwei der sechs RMS-Zelllinien). Als Ursache für das schlecht Ansprechen der

RMS-Zelllinien auf FAS-L wurde gezeigt, dass keine der untersuchten RMS-Zelllinien den FAS-L-Rezeptor FAS auf der Zelloberfläche exprimiert, während RH1 eine ausreichende Expression zeigte (Abbildung 3.38 (D)).

Die Wirkung der chimären T-Zellen bei der oben vorgestellten T-Zelltherapie auf RMS-Zellen ist somit nicht FAS-L vermittelt.

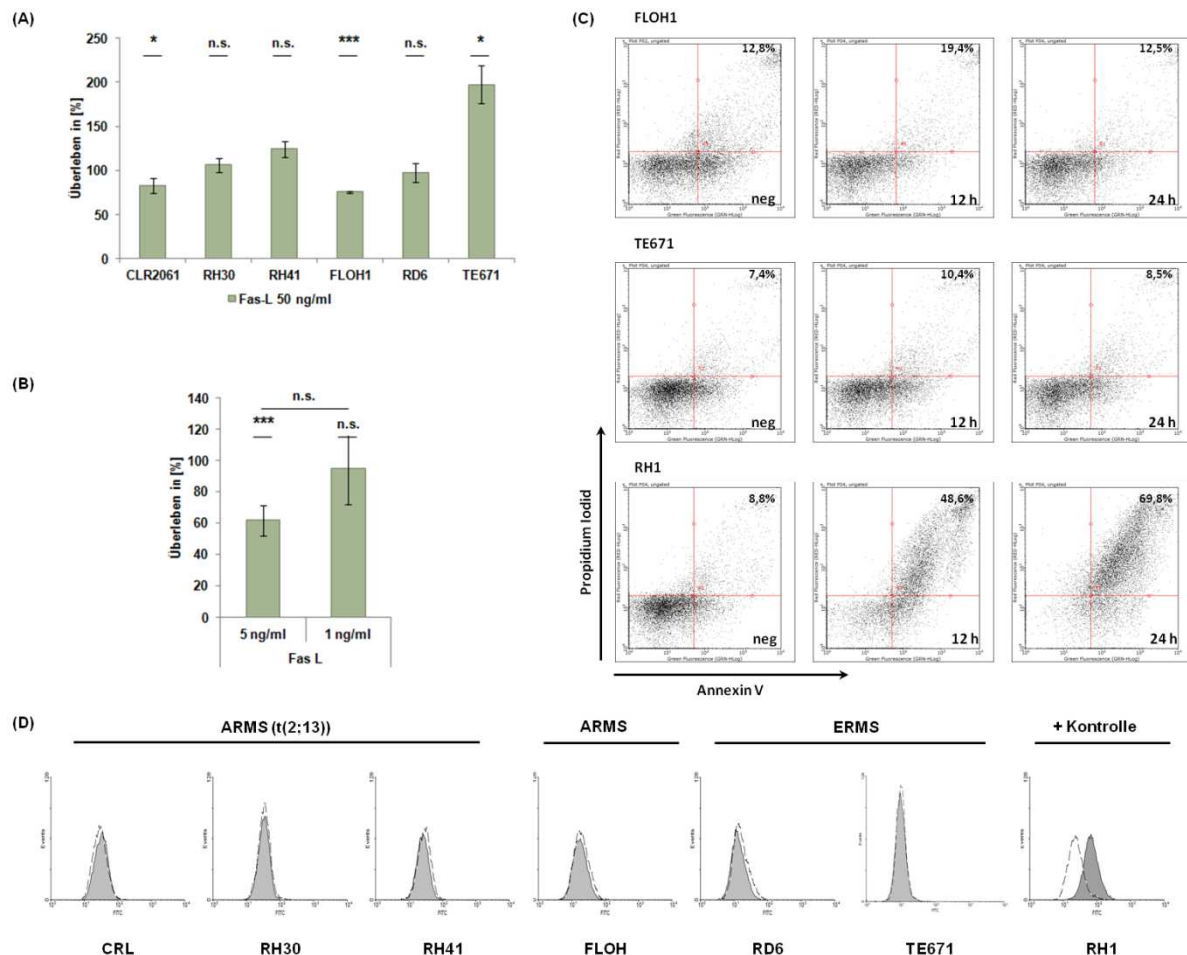


Abbildung 3.38: Einfluss von FAS-L auf das Überleben von RMS-Zelllinien. (A) Überlebensraten von RMS-Zelllinien nach Behandlung mit 50 ng/ml FAS-L über einen Zeitraum von 48 h in Medium mit 1% FBS. Die Überlebensrate nicht behandelten Zellen (nach 48 h) wurde mit 100% angenommen. Gezeigt sind die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen. (B) Überlebensrate der Ewing-Sarkom-Zelllinie RH1 nach Behandlung mit 1 und 5 ng/ml FAS-L über einen Zeitraum von 48 h in Medium mit 1% FBS. Die Überlebensraten nicht behandelten Zellen (nach 48 h) wurde als 100 % angenommen. (C) „Dot Blot“ einer Annexin V/PI-Färbung Doppelfärbung bei FAS-L (50 ng/ml) behandelten FLOH1-, TE671- und RH1- (positive Kontrolle) Zellen nach 12 und 24 h Inkubationszeit. (D) Expression von FAS auf der Oberfläche von RMS-Zelllinien und der Ewing-Sarkom-Zelllinie RH1; gefüllte Histogramme entsprechen der Expression des Gens; offene Histogramme entsprechen der Sekundärantikörper-Kontrolle.

TNF α : Die Behandlung der RMS-Zelllinien mit TNF α führte – außer bei der ARMS-Zelllinie RH41 – zu keiner Proliferationshemmung (im MTT-Assay nach 48 h) (Abbildung 3.39 (A)).

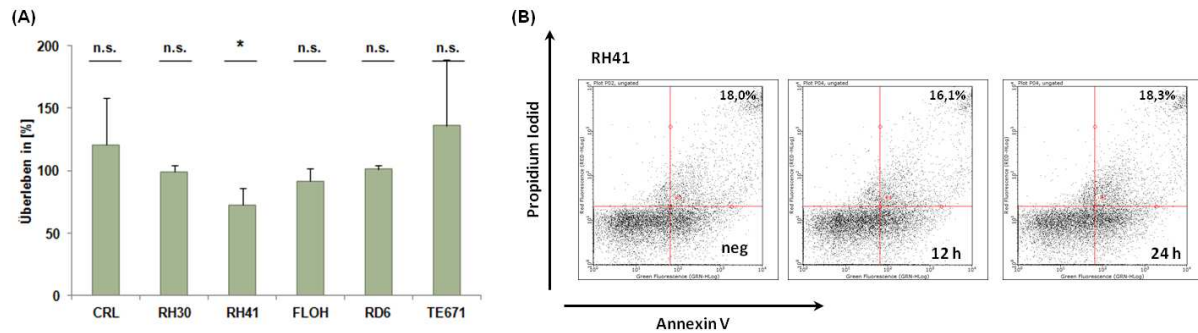


Abbildung 3.39: Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ auf das Überleben von RMS-Zelllinien. (A) Überlebensraten von RMS-Zelllinien nach Behandlung mit 10 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ über einen Zeitraum von 48 h in Medium mit 1% FBS. Die Überlebensrate nicht behandelter Zellen (nach 48 h) wurde als 100% angenommen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. (B) „Dot Blot“ einer Annexin V/PI-Färbung Doppelfärbung bei $\text{TNF}\alpha$ (50 ng/ml) behandelten RH41 nach 12 und 24 h Inkubationszeit.

Die $\text{TNF}\alpha$ bedingte, verminderte Anzahl von stoffwechselaktiven RH41 war ausschließlich auf eine Wachstumseinschränkung zurückzuführen, da in den durchflusszytometrischen Analysen weder RH41 (Abbildung 3.39 (B)) noch eine der anderen RMS-Linien (nicht gezeigt) eine Zunahme von Annexin V/PI-positiven Zellen aufwies.

3.6.2 Expression von apoptotisch relevanten Proteinen der intrinsischen Apoptoseregulation bei RMS

Wie oben gezeigt reagieren RMS-Zellen – von der einheitlichen Resistenz gegenüber $\text{IFN}\gamma$ und FAS-L abgesehen – recht unterschiedlich auf proapoptotische Stimuli einschließlich chimärer T-Zellen. Angesichts dieser Heterogenität und der zugrunde liegenden Mechanismen wurden im Rahmen dieser Arbeit auch die intrinsischen pro- und antiapoptotischen Faktoren untersucht, speziell solche die eine Relevanz für die Resistenz der RMS-Zelllinien gegenüber zytotoxischen T-Zellen haben könnten.

3.6.2.1 Expression bei RMS-Zelllinien

Um einen Überblick über die Bedeutung intrinsischer, Apoptose-relevanter Moleküle bei RMS-Zellen zu erhalten, wurde deren Expression zuerst auf RNA-Ebene mittels RT-qPCR analysiert und mit der Expression in gesunder Skelettmuskulatur verglichen.

Zu den ausgewählten *proapoptotischen* Molekülen gehörten Bax, Bid, Bim, Noxa, Puma und SMAC, von denen besonders Bax, Bid und Bim sowie Noxa bei RMS vermehrt exprimiert wurden, während SMAC keinen Expressionsunterschied aufwies und Puma herab reguliert war (Abbildung 3.40).

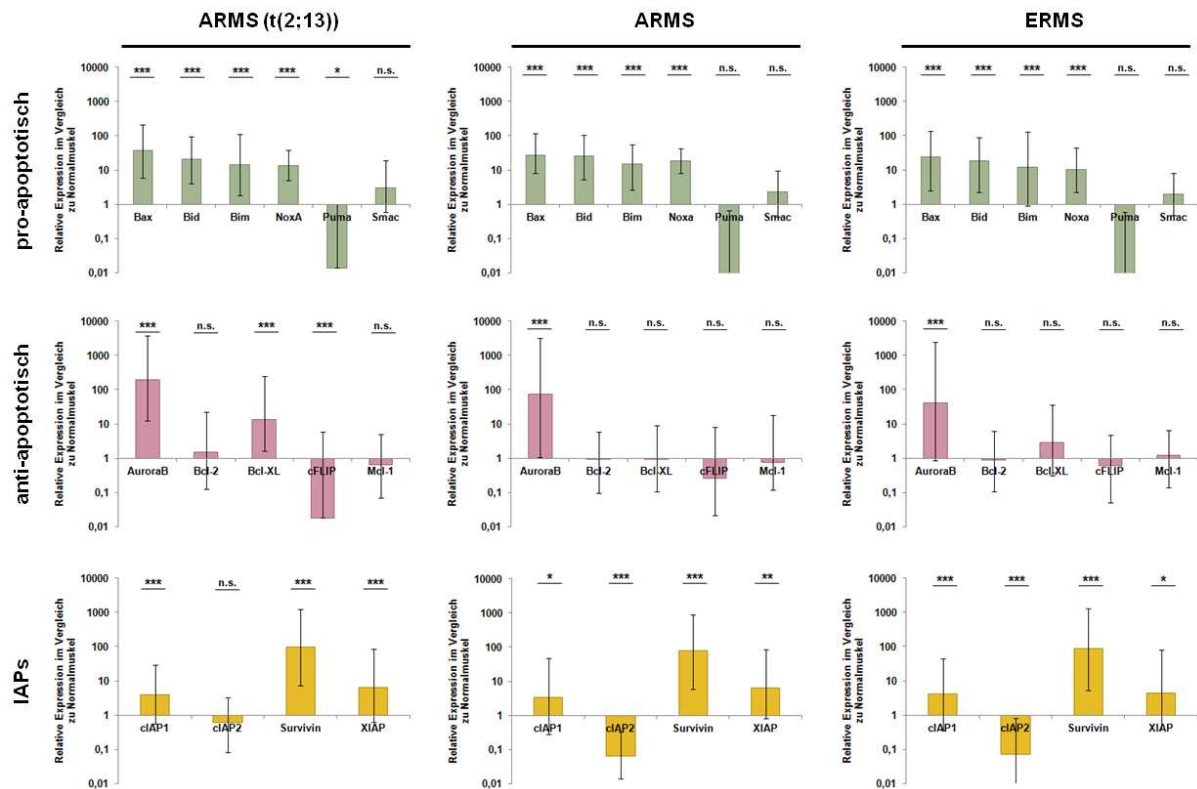


Abbildung 3.40: Relative Expression einiger ausgewählter pro- und antiapoptotischer Faktoren bei RMS. Die RMS-Zelllinien wurden anhand der verschiedenen Subtypen unterteilt dargestellt. Die Expression wurde auf GAPDH normalisiert und mit gesunder Skelettmuskulatur verglichen (RQ = 1); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$; RQ – relativer Quotient.

Demgegenüber wurden mehrere *antiapoptotische* Moleküle der Bcl-2-Familie (Bcl-2, Bcl-XL, und Mcl-1) in den RMS-Zelllinien nicht vermehrt exprimiert. Die quantitative RT-PCR-Analyse einer weiteren Familie antiapoptotischer Faktoren, die als IAP (*inhibitor of apoptosis*)-Familie bekannt ist, erbrachte hingegen eine Überexpression von drei der vier Familienmitglieder: cIAP1, XIAP und Survivin, wobei Survivin die stärkste Expressionssteigerung im Vergleich zu gesundem Muskel aufwies. cIAP2 wurde nicht signifikant anders als im Muskel exprimiert. Bzgl. dieses „antiapoptotischen Profils“ wiesen ARMS und ERMS keine starken Expressionsunterschiede auf (Abbildung 3.40).

Die vermehrte Expression der IAP-Mitglieder cIAP1, cIAP2, XIAP und Survivin wurde auf Proteinebene bestätigt. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass auch cFLIP, von allen RMS-Zelllinien ausreichend exprimiert wird und somit in die Apoptose-Induktion durch die oben betrachteten Todesrezeptoren eingreifen kann (Abbildung 3.41).

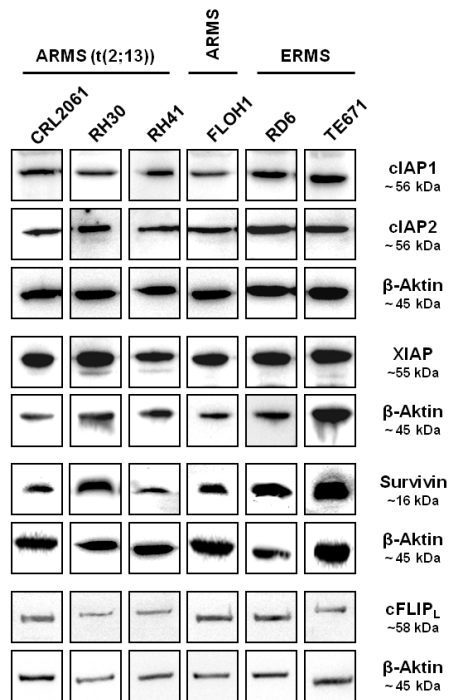


Abbildung 3.41: Western Blot der IAP-Mitglieder cIAP1, cIAP2, XIAP und Survivin sowie des antiapoptotischen Faktors cFLIP bei RMS-Zelllinien. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

3.6.2.2 Expression bei RMS-Geweben

Die Expression der *in vitro* untersuchten Faktoren wurde, wie im Fall der Oberflächenmoleküle, anhand der zur Verfügung stehenden RMS-Biopsien kontrolliert.

Auf transkriptioneller Ebene wurde, konkordant zu den Zelllinien, eine stark verminderte Expression des proapoptotischen Faktors Puma beobachtet. Bei den ERMS-Geweben war zudem die SMAC-Expression erniedrigt (Abbildung 3.42 (A)). Demgegenüber waren die antiapoptotischen Faktoren der Bcl-2-Familie und cFLIP im Vergleich zu Muskulatur signifikant hochreguliert, ein Befund der diskrepant zu den Befunden der RMS-Zelllinien war (vgl. Abbildung 3.40). Die Mitglieder der IAP-Familie, speziell cIAP1, Survivin und XIAP, zeigten, verglichen mit Muskulatur in RMS, ebenfalls eine verstärkte Expression und waren somit wiederum mit der Expression in den RMS-Zelllinien vergleichbar (Abbildung 3.42 A).

Auf Proteinebene wurde die Expression von cIAP1, cIAP2, XIAP, Survivin und cFLIP mittels Western Blot (Abbildung 3.42. (B)) und Immunhistochemie (Abbildung 3.42 (C)) untersucht und mit normaler Muskulatur verglichen. Dabei zeigte die IAP-Familie eine konsistente signifikante Überexpression in RMS gegenüber Muskulatur, während die cFLIP Überexpression minimal und nicht signifikant war (Abbildung 3.42 (D)).

Für die weitere Arbeit wurde der Schwerpunkt aufgrund der gleichmäßig starken Expression durch die RMS-Zelllinien und Gewebe (Abbildung 3.41 und 3.42) auf die antiapoptotischen Moleküle der IAP-Familie gelegt.

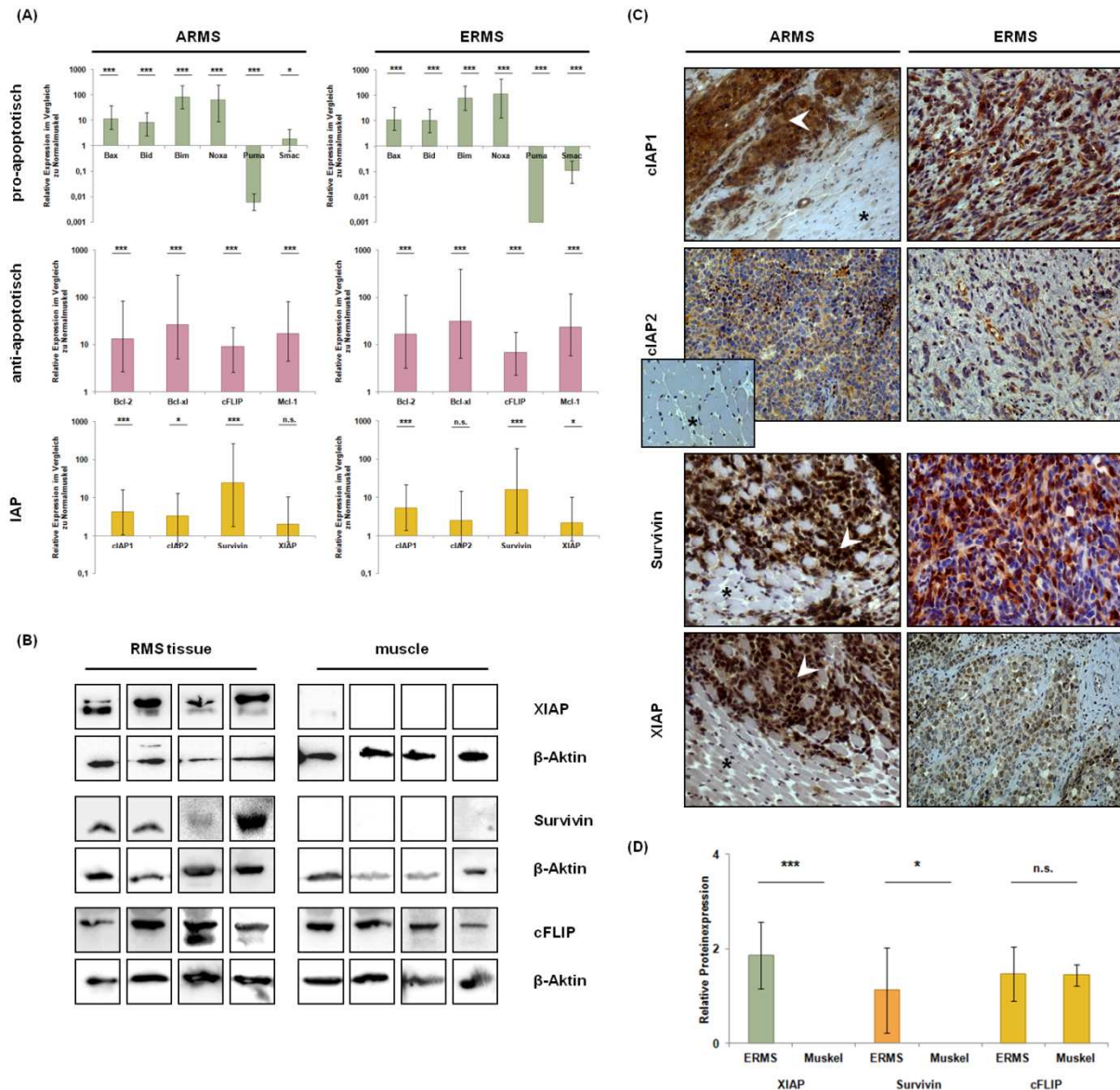


Abbildung 3.42: Relative RNA-Expression einiger ausgewählter pro- und antiapoptotischer Faktoren in RMS-Biopsien (ARMS: n = 10; ERMS: n = 10) im Vergleich zu gesunder Skelettmuskulatur (n = 5) (qRT-PCR; RQ = 1). Die Befunde wurden nach RMS Subtypen getrennt dargestellt. (B) Western Blot Analyse der Expression von XIAP, Survivin und cFLIP in ERMS und Muskelbiopsien; als Ladekontrolle diente β -Aktin. (C) IHC von cIAP1, cIAP2, Survivin und XIAP an je einer ARMS- und einer ERMS-Biopsie. Im Fall des cIAP1, XIAP und Survivin gefärbten ARMS lag ein muskelinfiltrierender Tumor vor, der Tumoranteil (mit einem Pfeil gekennzeichnet) lag in der Nachbarschaft cIAP1-, XIAP- und Survivin-negativer quergestreifter Muskulatur (*) (Immunperoxidase; 200-fache Vergrößerung) (D) Quantitative Analyse der XIAP-, Survivin- und cFLIP-Expression des in (B) dargestellten Western Blots. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

Beim Abgleich von Überlebens- (*overall survival*) und RNA-Daten stellte sich außerdem heraus, dass die Survivin-Expression negativ mit dem Überleben von ERMS-Patienten korreliert (Abbildung 3.43). Alle anderen Faktoren hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebensdauer (nicht gezeigt).

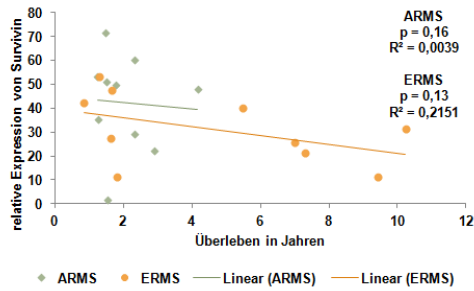


Abbildung 3.43: Zusammenhang zwischen der Survivin-Expression und der Überlebenszeit bei ERMS (n = 10) und ARMS (n = 10); die angegebenen p-Werte wurden mit der Statistiksoftware SAS berechnet.

3.6.2.3 Einfluss von SMAC-Mimetic (IAP-Antagonisten) auf RMS-Zelllinien

Unter präklinischen und translationalen Aspekten wurden die antiapoptotischen Moleküle der IAP-Familie bei RMS näher untersucht bzw. manipuliert. Da IAPs bei RMS-Zelllinien und Biopsien eine konkordante Überexpression zeigten, stellen die Zelllinien ein sinnvolles Modell der *In-vivo*-Situation dar.

Zunächst wurde die Inhibierung der IAPs durch ein sog. SMAC-Mimetic (IAP-Antagonist; IAP-A) angestrebt. SMAC-Mimetics sind kleine Moleküle, die sowohl die Aktivität von cIAP1 und cIAP2, als auch von XIAP inhibieren können. Der dadurch bedingte Abbau der IAP-Proteine in Kombination mit einer Induktion von NF- κ B und einer gesteigerten Sekretion von TNF α soll die Induktion der Apoptose bewirken²⁶⁶.

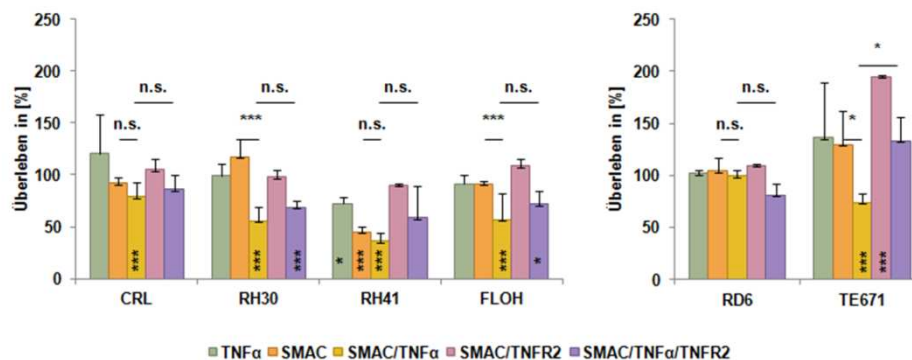


Abbildung 3.44: Einfluss von TNF α und eines SMAC-Mimetic auf Wachstum und Überlebensrate von RMS-Zelllinien. Die Zellen wurden für 48 h mit Zugabe von TNF α , SMAC-Mimetic (100 nM) sowie löslichem TNF α -Rezeptor-2 zum Abfangen des TNF α in verschiedenen Kombinationen inkubiert und die Überlebensrate mittels MTT-Test bestimmt. Die Überlebensrate nicht behandelter Zellen wurde mit 100% angenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Tests sowie die Standardabweichungen der Mittelwerte. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,005, SMAC – SMAC-Mimetic, TNFR2 - TNF α -Rezeptor-2.

Für den in Abbildung 3.44 dargestellten Toxizitätstest wurden die Tumorzellen einer Zelllinie jeweils mit DMSO (negative Kontrolle – 100% Überlebensrate), TNF α , SMAC-Mimetic und SMAC-Mimetic in Kombination mit TNF α (jeweils mit DMSO) inkubiert. In zwei weiteren

Ansätzen wurde zu dem Antagonisten löslicher TNF α -Rezeptor-2 (TNFR2) zugegeben, der TNF α abfangen und so dessen Wirkung aufheben soll. Der Versuchsaufbau konnte zeigen, dass mit Ausnahme von RH41 keine der RMS-Zelllinien sensitiv für TNF α ist (vgl. Abschnitt 3.6.1 - TNF α). Die durch den SMAC-*Mimetic* induzierte TNF α Sekretion führte lediglich bei RH41 zu einer verminderten Überlebensrate, während alle anderen Zelllinien keine Wachstumseinschränkungen aufwiesen. In Kombination mit TNF α konnte hingegen bei fast allen Zelllinien eine Proliferationseinschränkung beobachtet werden, die bei RH41 am stärksten ausgeprägt war. In Anwesenheit des löslichen TNFR2 nahm die Apoptoserate erwartungsgemäß ab, war jedoch nur im Falle der ERMS-Zelllinie TE671 signifikant.

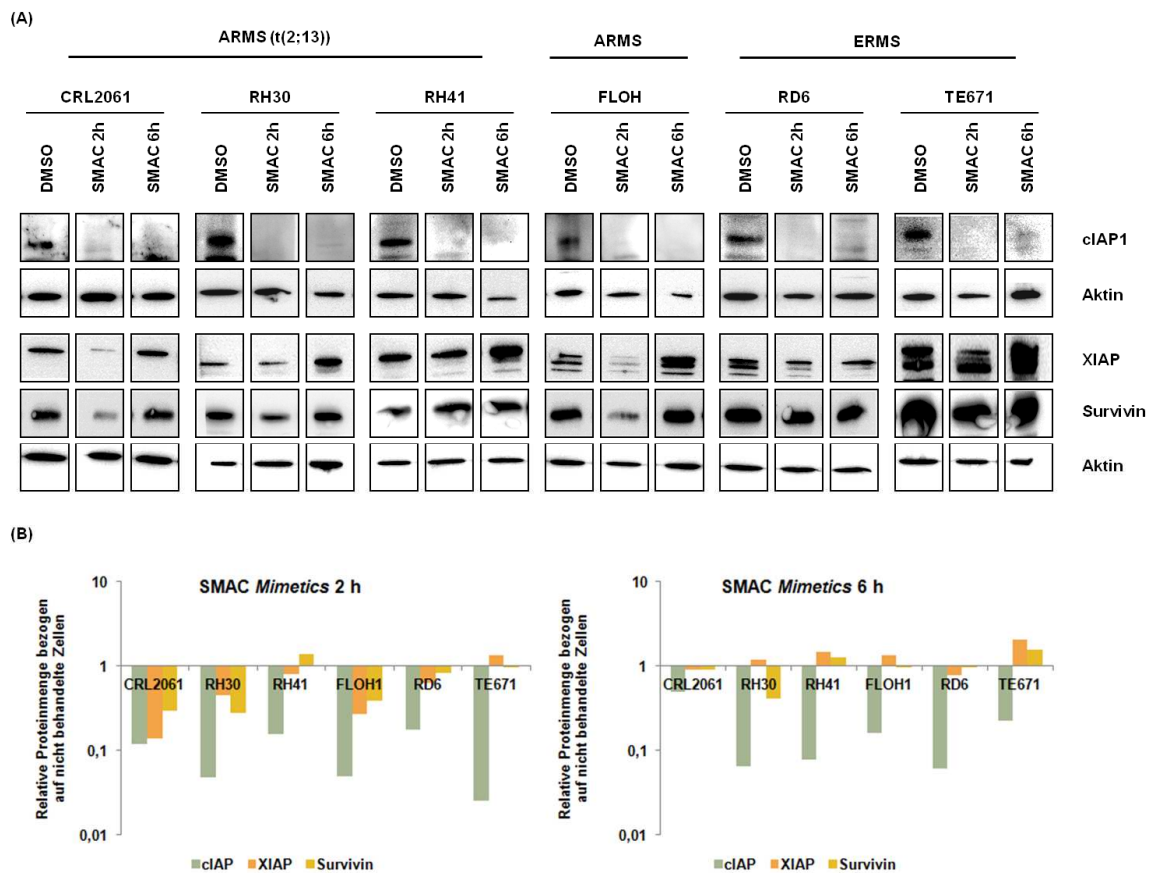


Abbildung 3.45: (A) Western Blot Analyse zum Nachweis der cIAP1- und XIAP-Expression nach 2- und 6-stündiger Behandlung mit 100 nM SMAC-*Mimetic*; als Negativkontrolle dienten mit DMSO behandelte Zelllinien, welches als Trägersubstanz für den SMAC-*Mimetic* verwendet wurde; als Ladekontrolle diente β -Aktin. (B) Quantitative Auswertung des in (A) gezeigten Western Blot. SMAC – SMAC-*Mimetic*.

Auf Proteinebene wurden sowohl 2 h als auch 6 h nach Zugabe des SMAC-*Mimetic* eine Verminderung der cIAP1-Proteinkonzentration dokumentiert (Abbildung 3.45). Im Gegensatz dazu trat eine Verringerung der XIAP-Proteinmenge nur zu Beginn der Inkubationszeit (2 h) auf und erreichte nach 6 h wieder Ausgangsniveau. Bei CRL2061 und FLOH1 wurde

zusätzlich eine Abnahme der Survivin-Konzentration beobachtet, die jedoch nach 6 h ebenfalls wieder auf das Ausgangsniveau anstieg (Abbildung 3.45 (B)).

3.6.2.4 Wirkung von SMAC-Mimetics in Kombination mit chimären T-Zellen auf RMS

Eine effektive Wirkung des SMAC-Mimetic wurde bei den meisten RMS-Zelllinien nur in Kombination mit TNF α beobachtet. Das schnelle Umschalten der RMS-Zelllinien während der Behandlung hin zu einer verstärkten XIAP-Expression, nachdem zunächst ein Proteinabbau erfolgte, spielte dabei sicherlich eine zentrale Rolle. Allerdings blieb der cIAP1 „*knock down*“ bestehen, womit ein zentrales antiapoptotisches Molekül ausgeschaltet wurde. Dieser Umstand könnte bei einer Kombination aus SMAC-Mimetics und chimären T-Zellen RMS angreifbarer machen und so auch die Effektivität der T-Zelltherapie verbessern. In früheren Arbeiten wurde außerdem gezeigt, dass SMAC-Mimetics die Aktivität chimärer T-Zellen positiv beeinflussen können²⁶⁷.

Dazu wurden in einem Vorversuch PBLs bzw. chimäre T-Zellen mit 100 nM des SMAC-Mimetic über einen Zeitraum von 48 h kultiviert. Der Zeitraum entsprach dabei der Dauer der Kokultivierung von chimären T- und RMS-Zellen. Die Behandlung der T-Zellen mit dem SMAC-Mimetic führte allerdings zu einem Verlust lebender Zellen, der im Falle der chimären T-Zellen sogar etwas stärker ausgeprägt war als bei nicht-transduzierten PBLs (Abbildung 3.46).

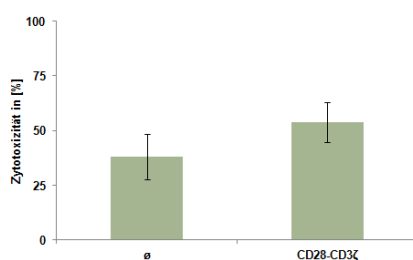


Abbildung 3.46: Einfluss des SMAC-Mimetic auf chimäre T-Zellen. Der MTT-Zytotoxizitätstest zeigt die Zytotoxizitätsrate von 100 nM SMAC-Mimetic nach 48-stündiger Inkubation mit PBLs und „CD28-CD3 ζ “-chimären T-Zellen. Die Zytotoxizitätsrate nicht behandelter Zellen wurde mit 0% angenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikaten sowie die Standardabweichung des Mittelwertes.

Wegen dieser Ergebnisse wurde die Kombination von SMAC-Mimetic und zytotoxischen T-Zellen vermieden. Für die Zytotoxizitätsversuche wurden die RMS-Zelllinien CRL2061 (ARMS (t(2;13))), FLOH1 (ARMS) und RD6 (ERMS) mit 100 nM SMAC-Mimetic bei einem Serumgehalt von 1% über einen Zeitraum von 24 h vorbehandelt. Anschließend wurde der Wirkstoff entfernt und die Zellen zusammen mit den zytotoxischen T-Zellen über weitere 48 h kultiviert.

Weder bei der ARMS-Zelllinie CRL2061 noch bei der ERMS-Zelllinie RD6 wurden signifikant bessere Lyseraten durch die Vorbehandlung mit *SMAC-Mimetic* erzielt (Abbildung 3.47). Dahingegen konnte die Effektivität der chimären T-Zellen bei mit *SMAC-Mimetic* behandelten FLOH1-Zellen gesteigert werden. Die Vorbehandlung erzielte somit bei zwei der drei Zelllinien keinerlei Effekt, sodass dieser Ansatz hier nicht weiter verfolgt wurde. Zur Präzisierung der Wirkung von *SMAC-Mimetics* Aussage sind jedoch weitere Untersuchungen nötig.

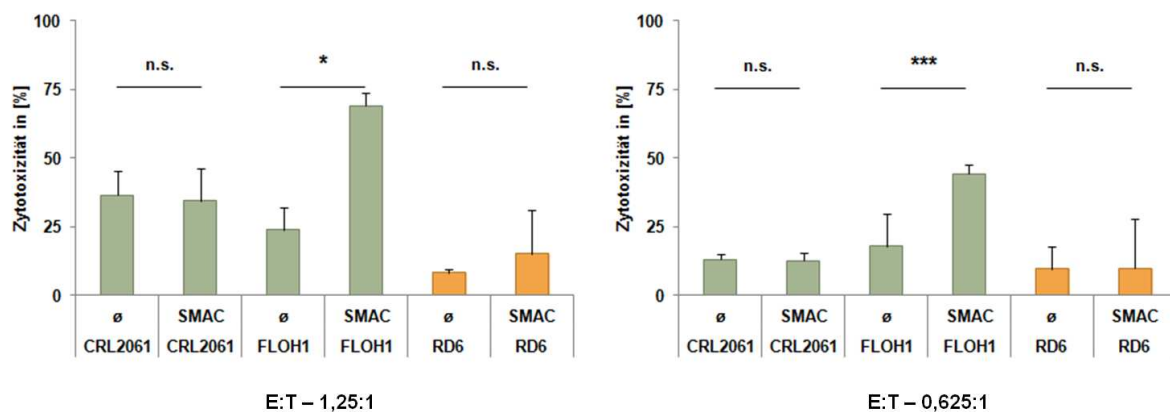


Abbildung 3.47: MTT-Zytotoxizitätstest von verschiedenen RMS-Zelllinien nach Vorbehandlung (24 h) mit *SMAC-Mimetic* und der Kokultivierung mit chimären T-Zellen („CD28-CD3“). Gezeigt sind zwei verschiedene Effektor:Targetzellverhältnisse. Die Zytotoxizitätsrate bei der Kultivierung mit PBL wurde mit 0% angenommen.
 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, SMAC – *SMAC-Mimetic*.

3.6.2.5 IAP-Regulation

Abschnitt 3.6.1 beschäftigt sich mit der extrinsischen Apoptose-Induktion bei RMS-Zelllinien durch die Stimulation mit TRAIL, FAS-L und TNF α . Aufgrund der bei den RMS-Zelllinien doch recht eingeschränkten apoptotischen Wirkung, wurde neben dem apoptotischen auch der proliferative Stoffwechselweg der Todesrezeptoren betrachtet. Die Stimulation der Rezeptoren führt dabei über die Aktivierung des NF- κ B-Weges zu einer Aktivierung diverser MAP-Kinasen sowie einer verstärkten Expression der IAP-Genfamilie⁹¹ und dadurch zu einer erhöhten Apoptoseresistenz. Die unzureichende Degradierung der IAP-Proteine nach der Behandlung mit *SMAC-Mimetics* kann über TNF α ebenfalls NF- κ B induzieren und damit die verstärkte Expression der IAPs bedingen. Der Einfluss von TRAIL, TNF α , *SMAC-Mimetic* sowie INF γ auf die IAP-Genfamilie wurde zunächst nur mittels qRT-PCR untersucht (Abbildung 3.4).

Insgesamt wurde die Genexpression bei den RMS-Zelllinien durch die verschiedenen Wirkstoffe sehr unterschiedlich beeinflusst. Während CRL2061, RH30 und RD6 bei den

eingesetzten Substanzen zu einer verstärkten Expression der untersuchten Gene tendierten (vermehrt ohne Signifikanz), schienen RH41, FLOH1 und TE671 weniger stark beeinflusst zu werden. Bei der ARMS-Zelllinie RH41 reagierten vorrangig cIAP1 und cIAP2, während bei der ERMS-Zelllinie TE671 eine Induktion verschiedener Gene nur durch TNF α erfolgte und die Behandlung mit TRAIL bei fast allen Genen zu einer verminderten Expression führte (Abbildung 3.48).

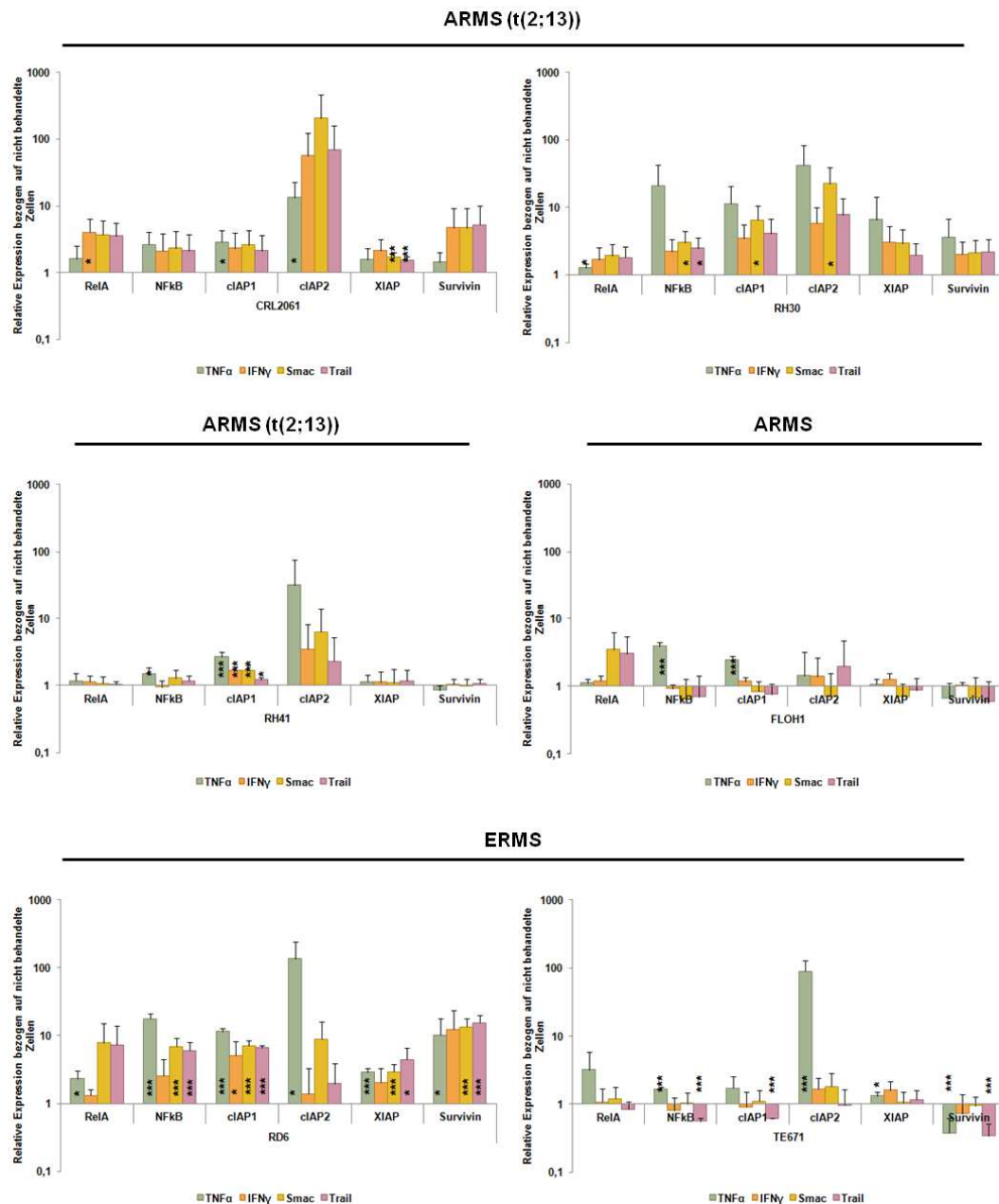


Abbildung 3.48: Relative RNA-Expression von RelA, NF-κB, cIAP1, cIAP2, XIAP und Survivin 6 h nach Inkubation mit TNF α , IFN γ , SMAC-Mimetic oder TRAIL im Vergleich zu nicht behandelten Zellen (RQ = 1). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier Messungen. Die Befunde wurden nach RMS-Subtypen getrennt dargestellt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, RQ - relativer Quotient, SMAC – SMAC-Mimetic.

Nach diesen Ergebnissen müsste gerade TE671 besonders sensitiv auf TRAIL reagieren, während Linien wie CRL2061, RH30 und RD6 durch die verstärkte Expression antiapoptotischer Proteine besonders resistent sein sollten. Diese Beobachtungen konnten so, wie in Abschnitt 3.6.1 und 3.6.2.3 gezeigt, nicht bestätigt werden. Eine Western Blot Analyse nach einer 12-stündigen Inkubationsperiode mit TRAIL erbrachte zudem keine wesentlichen Unterschiede in der Proteinexpression von cIAP1, cIAP2, Survivin oder XIAP (Abbildung 3.49); ebenso wie die 12-stündige Behandlung mit TNF α bzw. IFN γ (nicht gezeigt).

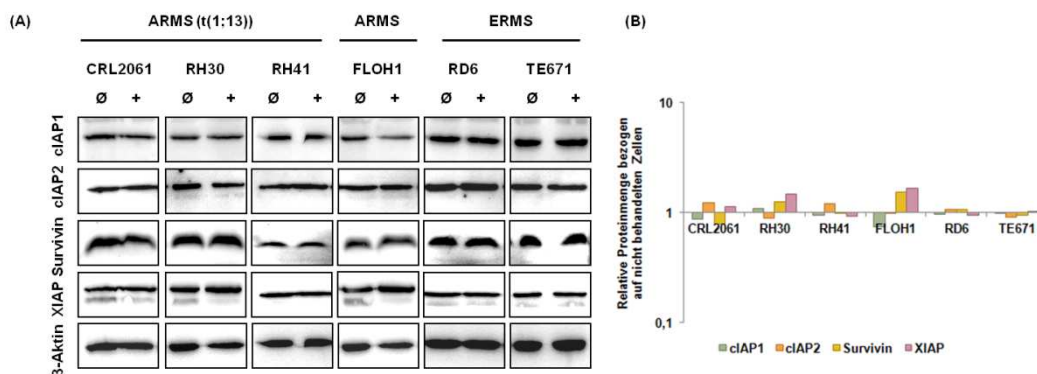


Abbildung 3.49: (A) Western Blot Analyse der IAP-Genfamilie nach Behandlung der RMS-Zelllinien mit 10 ng/ml TRAIL über einen Zeitraum von 12 h; β -Aktin diente als Ladekontrolle. (B) Quantitative Auswertung des in (A) gezeigten Western Blots bezogen auf nicht behandelte Zellen.

3.6.2.6 Inhibierung von Survivin bei RMS-Zelllinien

Sowohl die alleinige Behandlung von RMS-Zelllinien mit einem SMAC-Mimetic als auch die Kombinationsbehandlung mit chimären T-Zellen führte nicht zu den erhofften zytotoxischen Effekten. Der durch den eingesetzten SMAC-Mimetic bedingte Abbau der antiapoptotischen Faktoren cIAP1 und XIAP war zur Auslösung der Apoptose bei den untersuchten RMS-Zellen nicht ausreichend. Im Folgenden wurde daher der Einfluss von Survivin auf die Überlebensrate von RMS-Zellen untersucht, dass wie cIAP1 und XIAP zur antiapoptotischen IAP-Familie gehört und in allen Zelllinien vermehrt exprimiert wurde (Abbildung 3.40 und Abbildung 3.42). Zudem wurde bereits ein Zusammenhang zwischen der Survivin-Expression und dem Überleben von RMS-Patienten hergestellt (Abbildung 3.43).

Da die Survivin-Expression durch den SMAC-Mimetic nur kurzfristig in den Zelllinien CRL2061 und FLOH1 beeinflusst wurde (Abbildung 3.45) ohne einen Einfluss auf das Wachstum der Zelllinien zu haben (Abbildung 3.44), wurden zur signifikanten und längerdauernden Inhibierung der Survivin-Expression siRNA-Experimente durchgeführt.

Der Survivin „*knock down*“ führte bei den getesteten Zelllinien sowohl auf RNA- als auch Proteinebene zu einer Expressionsminderung (Abbildung 3.50 (A) und (B)).

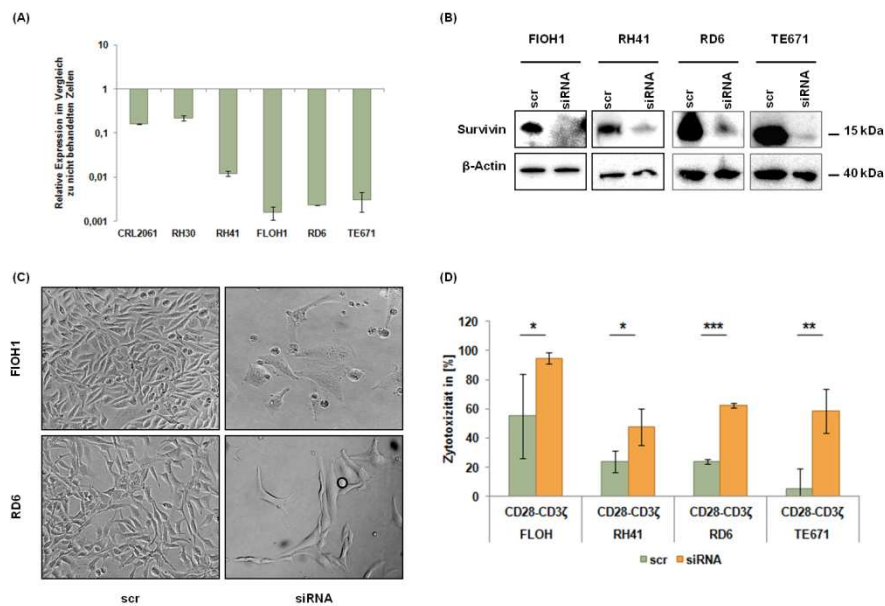


Abbildung 3.50: (A) qRT-PCR nach Survivin „*knock down*“ mit spezifischer siRNA bei den RMS-Zelllinien im Vergleich zu *scrambled*-siRNA (RQ = 1); RQ – relativer Quotient (B) Western Blot 48 h nach Survivin „*knock down*“ am Beispiel von FLOH1, RH41, RD6 und TE671; als Ladekontrolle diente β-Aktin (C) morphologische Veränderung am Beispiel von FLOH1 und RD6 mit *scrambled*-siRNA und spezifischer siRNA gegen Survivin (D) MTT-Zytotoxizitätstest nach Survivin „*knock down*“ mit spezifischer siRNA bzw. *scrambled*-siRNA nach Kokultivierung (48 h) mit „CD28-CD3ζ“-chimären T-Zellen bei einem Effektor:Targetzellverhältnis von 1,25:1. Die Zytotoxizität von nicht modifizierten T-Zellen wurde als 0% angenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikaten mit den Standardfehlern der Mittelwerte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, *scr* – *scrambled*.

Gleichzeitig wurden morphologische Veränderungen induziert, die sich in einer extremen Größenzunahme äußerten. Dies ist mutmaßlich auf einen G2/M-Phase-Arrest zurückzuführen, da Survivin neben antiapoptotischen Funktionen auch Zellzyklus-Aufgaben übernimmt^{268 269}. Die Kokultivierung von chimären T-Zellen und RMS-Zellen nach einem Survivin „*knock down*“ führte bereits bei einem geringen Effektor:Targetzellverhältnis von 1,25:1 zu einer signifikanten Steigerung der Lyserate. Insbesondere bei den beiden, im Normalfall sehr resistenten ERMS-Zelllinien lagen die Zytotoxizitätsraten um 40-50% höher.

3.6.2.7 Auswirkung des Survivin knock down in RMS-Zellen auf die Expression anderer antiapoptotischer Moleküle

Neben Bedeutungen für Zellzyklus und Apoptose, wurden für Survivin stabilisierende Effekte auf XIAP beschrieben¹³⁷. Eine Analyse der Expression der anderen IAP-Mitglieder, ebenso wie von cFLIP, war somit die logische Konsequenz.

Abbildung 3.51 zeigt die quantitative Bestimmung der untersuchten Gene. Dabei fällt insbesondere die, wenn auch nicht signifikante, Expressionssteigerung von cIAP2 bei CRL2061, RD6 und TE671 auf. Die Expressionsrate aller anderen Gene änderte sich nicht wesentlich. Eine Ausnahme bildet die ARMS-Linie CRL2061, die nach einem Survivin „*knock down*“ eine vermehrte Bildung von cFLIP zeigt.

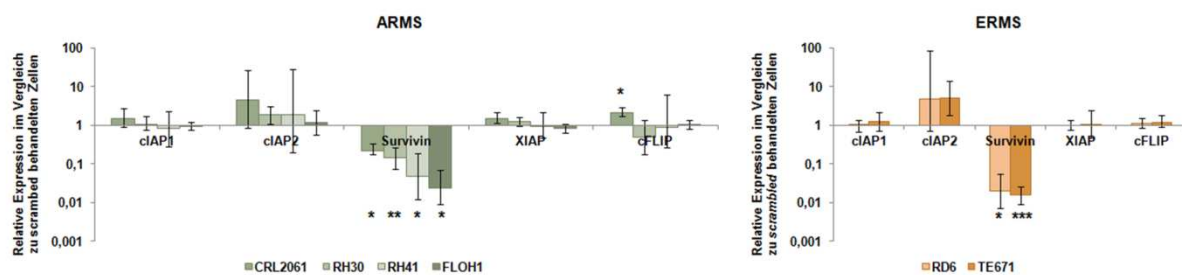


Abbildung 3.51: relative Quantifizierung der IAP-Mitglieder sowie cFLIP nach Survivin *knock down* im Vergleich zu scrambled siRNA (RQ = 1). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, RQ – relativer Quotient.

3.6.2.8 Inhibierung von Survivin durch den selektiven Cox-2 Inhibitor Celecoxib

Das vorrangegangene Kapitel zeigt, dass eine Kombination aus Survivin „*knock down*“ und chimären T-Zellen die Effektivität der RMS-Zelllyse verstärken kann. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde nach einer therapeutisch anwendbaren Alternative mit inhibierendem Effekt auf die Survivin-Expression gefahndet, die auch für die Anwendung im Menschen geeignet wäre. Als Inhibitor der Survivin-Expression wurde unter anderem der spezifische Cox-2-Inhibitor Celecoxib beschrieben, der zur Behandlung bei degenerativen Gelenkerkrankungen, chronischer Polyarthrititis und Morbus Bechterew zugelassen ist²⁷⁰. Zur Bestimmung der optimalen Konzentration für eine Survivin-Inhibierung wurde eine Konzentrationsreihe ausgetestet bei der sich eine Konzentration von 60 μM als Kompromiss zwischen Substanztoxizität und effektiver Inhibierung der Survivin-Expression festgelegt wurde.

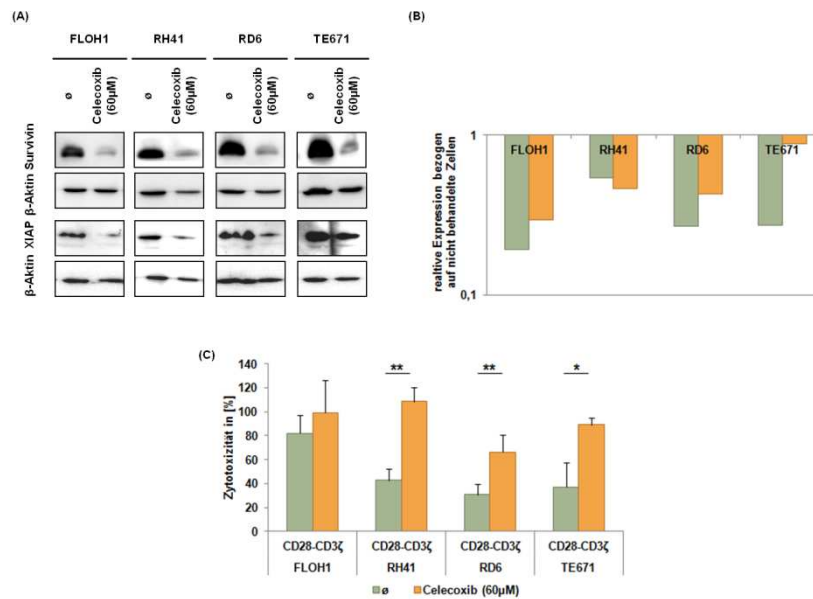


Abbildung 3.52: (A) Western Blot 48 h nach Behandlung mit 60 μM Celecoxib am Beispiel von FLOH1, RH41, RD6 und TE671; als Ladekontrolle diente β-Aktin; (B) Quantitative Analyse des in (A) dargestellten Western Blots. (C) MTT-Zytotoxizitätstest nach Survivin „knock down“ durch die Behandlung mit 60 μM Celecoxib und Kokultivierung (48 h) mit „CD28-CD3ζ“-chimären T-Zellen bei einem Effektor:Targetzellverhältnis von 2,5:1. Die Zytotoxizität von nicht modifizierten T-Zellen wurde als 0% angenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Triplikaten mit den Standardfehlern der Mittelwerte. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,005.

Der im Falle der spezifischen siRNA beobachtete Zellzyklusarrest konnte auch nach einer 48 h Inkubation mit Celecoxib beobachtet werden (nicht gezeigt), in dessen Verlauf eine starke Größenzunahme der RMS-Zellen zu verzeichnen war.

Die Behandlung der RMS-Zelllinien FLOH1, RH41, RD6 und TE671 mit Celecoxib reduzierte in allen Fällen signifikant die Survivin- (Abbildung 3.52 (A)), ebenso wie die XIAP-Proteinmenge. Damit ging, wie schon im Falle der siRNA, eine Steigerung der CAR-vermittelten Zytotoxizität einher (Abbildung 3.52 (C)).

3.7 *In-vivo*-Mausexperimente

Auf Grundlage der oben beschriebenen Ergebnisse wurden *In-vivo*-Experimente durchgeführt, um die Wirksamkeit chimärer T-Zellen alleine und in Kombination mit Celecoxib zu testen. In einem Pilotversuch zur Bestimmung des tumorigenen Potentials der beiden resistenten ERMS-Zelllinien, RD6 und TE671, erhielten jeweils fünf NOD/SCID-Mäuse *subcutane* Injektionen mit 5×10^5 , 1×10^6 oder $2,5 \times 10^6$ Tumorzellen, aus denen sich bei allen Mäusen (n = 30) nach 2-3 Wochen Tumoren entwickelten (Abbildung 3.53), was das tumorigene Potential der Zelllinien belegte. Eine Metastasierung trat nicht auf.

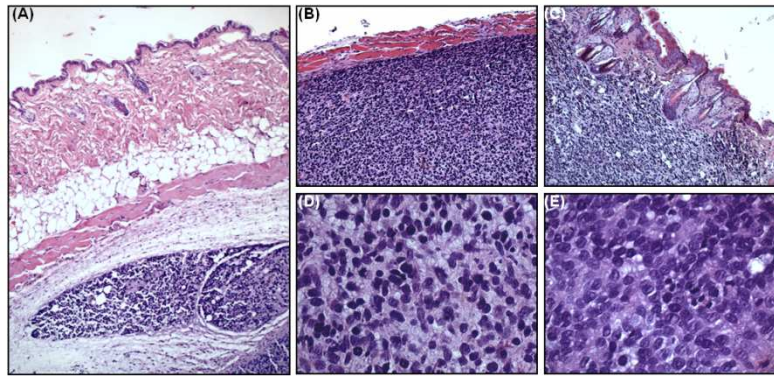


Abbildung 3.53: Lokalisierte *subcutane* Xenografts an den Injektionsstellen der humanen RMS-Zelllinien RD6 und TE671 im Bereich der Flanken immundefizienter NOD/SCID Mäuse. (A) Gut umschriebener subkutaner RMS-Tumorknoten; Vergrößerung 100-fach. (B) Gut abgrenzbarer nicht invasiver Tumor; Vergrößerung 100-fach. (C) Ausbildung eines in die Haut infiltrierenden invasiven RMS-Tumors; Vergrößerung 100-fach. (D) Detailaufnahme eines *in vivo* aus der Zelllinie RD6 entstandenen Tumors (200-fach). (E) Detail eines *in vivo* aus der Zelllinie TE671 hervorgegangenen Tumors. Alle Schnitte HE Färbung.

Die Expression der *in vitro* untersuchten Oberflächenmoleküle (AChR, B7.1, B7.2, CD54) blieb *in vivo* unverändert (nicht gezeigt). Als Voraussetzung für eine erfolgreiche T-Zell Therapie wiesen zudem alle Tumore eine gute Vaskularisierung auf (nicht gezeigt).

Zur Behandlung Xenotransplantat-tragender Mäuse mit chimären T-Zellen *in vivo*, wurden in NOD/SCID-Mäusen zuerst Tumoren durch *subcutane* Injektion von 5×10^6 Zellen erzeugt. Dann erfolgte eine jeweils einmalige Applikation von 1×10^7 Zellen der anti-fAChR-spezifischen T-Zellen („CD28-CD3 ζ “) pro Maus über die Schwanzvene bei einer Tumorgroße zwischen 100 und 150 mm³. Es war vorgesehen, die Behandlung mit Celecoxib 7 Tage vor der Injektion chimärer T-Zellen mit 2-tägigen *intraperitonealen* Injektionen mit jeweils 25mg Celecoxib/kg zu beginnen. Obwohl von anderen Arbeitsgruppen unter ähnlichen Bedingungen bereits Celecoxib *In-vivo*-Experimente durchgeführt worden waren²⁷¹⁻²⁷³, hatte der Wirkstoff eine toxische Wirkung auf den hier verwendeten Mausstamm. Keine der Mäuse überlebte die Behandlung, sodass die Survivin „*knock down*“-Experimente im Rahmen dieser Arbeit abgebrochen wurden und mit einem weniger toxischen Wirkstoff wiederholt werden müssen. Die Behandlung der Mäuse mit chimären T-Zellen und nicht-transduzierten T-Zellen ist in Abbildung 3.54 dargestellt.

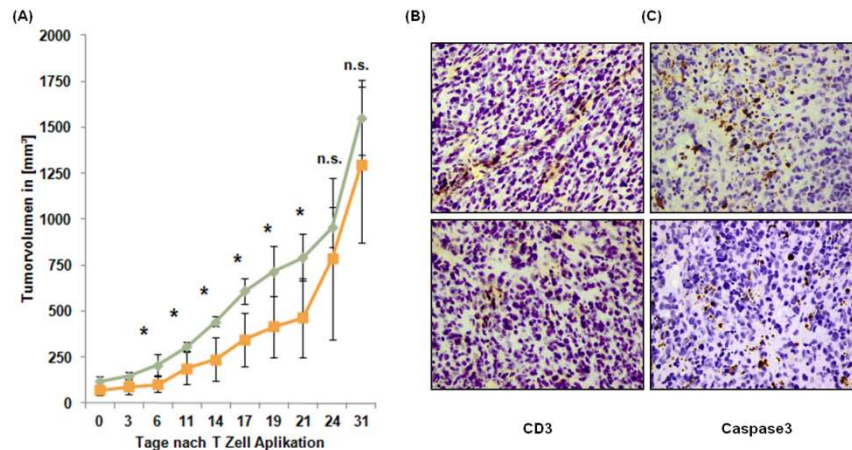


Abbildung 3.54: (A) Tumorwachstum bei immundefizienten Mäusen ($n = 4$) nach einmaliger Applikation von nicht-transduzierten T-Zellen und fAChR-spezifischen „CD28-CD3 ζ “-chimären T-Zellen. Das Tumorwachstum ist ab dem Zeitpunkt der T-Zell Injektion über einen Zeitraum von 31 Tagen dargestellt. Die Tumorgöße wurde mittels Schieblehre bestimmt. (B) Immunhistochemische Darstellung tumorinfiltrierender humaner peripherer chimärer Blutlymphozyten (anti-CD3 Färbung; Immunperoxidase; Vergrößerung x200). (C) Immunhistochemische Darstellung von Caspase 3-positiven, apoptotischen Tumorzellen (Immunperoxidase; Vergrößerung x200).

Bis zum Tag 21 verlief das Tumorwachstum bei den Mäusen, die mit chimären T-Zellen behandelt worden waren, signifikant langsamer, als bei den Kontroll-Mäusen, die nicht-transduzierte T-Zellen erhalten hatten. Nach drei Wochen verstärkte sich das Wachstum bei der mit chimären T-Zellen behandelten Gruppe und wies nach weiteren 10 Tagen ein ähnliches Tumolvolumen wie die Kontroll-Gruppe auf. Die post-mortem entnommenen Tumoren wurden immunhistochemisch untersucht und wiesen eine Infiltration mit humanen CD3 positiven T-Zellen auf. Desweiteren wurden apoptotische, Caspase 3-positive Tumorabschnitte gefunden (Abbildung 3.54). Ein Aktivitätsnachweis der tumorinfiltrierenden zytotoxischen T-Zellen über eine Perforin/Granzym B-Färbung gelang allerdings nicht.

4 DISKUSSION

4.1 Hintergrund, Ziel und Strategie der Arbeit

Hintergrund: Die Prognose von Patienten mit lokalisierten Rhabdomyosarkomen (RMS) hat sich dank multimodaler Therapien in den letzten 30 Jahren stark verbessert (mittlere Heilungsraten von 70-80%)^{203 274 275}. Demgegenüber blieb die schlechte Prognose bei Patienten mit primär metastasierten RMS (15% der RMS) bestehen (Überlebensraten 20-30%)^{196 202 205 275}. Dafür wird u.a. eine „*Multidrug Resistance*“ (MDR)²⁷⁶ verantwortlich gemacht, wobei unklar ist, ob dieses auf klonaler Selektion oder der Hochregulierung von MDR-assoziierten Genen beruht²⁷⁷. In jedem Fall besteht Konsens darüber, dass metastasierte Rhabdomyosarkome neue Therapieansätze erfordern, die residuelle Tumorzellen nach einer Chemotherapie effizient eliminieren sollen²⁷⁸⁻²⁸⁰.

Der Einsatz immuntherapeutischer Methoden war nach deren Erfolg bei der Therapie von Melanomen und Lymphomen naheliegend²⁸¹⁻²⁸⁴. Versuche, mit Antigen-unabhängigen Zytokin-induzierten Killerzellen (CIK)²³¹ oder NK-Zellen²⁸⁵ zeigen jedoch, dass RMS-Zellen zwar lysiert wurden, die Effektivität, v.a. der CIKs aber gering war²³¹. Da CIKs und NK-Zellen eine nur geringe Tumorspezifität besitzen, erschienen tumorspezifischere Strategien wünschenswert. Unter diesen besitzt der adoptive Transfer von T-Zellen mit Expression RMS-spezifischer chimärer Antigenrezeptoren theoretische und wahrscheinlich praktische Vorteile gegenüber tumorinfiltrierenden Lymphozyten oder von Vakzinierungen, wie sie bei translokations-positiven ARMS zurzeit getestet werden²⁰⁶.

Erstens bieten T-Zellen mit spezifischen, gegen den fAChR²⁰⁹ gerichteten chimären Rezeptoren theoretisch die Gewähr, beim Einsatz *in vivo* nur minimale unerwünschte Nebeneffekte zu zeigen, da der fAChR auf relevanten Normalgeweben postnatal nicht vorkommt^{248 286}.

Zweitens ist die Isolierung autologer Blutlymphozyten (anders als von intra-tumörösen Lymphozyten) als Ausgangszellen für die Therapie einfach und effizient. Die Lymphozyten können *vor* der Chemotherapie isoliert, *in vitro* transduziert und bis zum Zeitpunkt der Immuntherapie, ähnlich Stammzellen, eingefroren werden. Da die T-Zell-Transduktion zu einer starken Proliferation chimärer T-Zellen führt, lassen sich aus relativ wenigen Ausgangszellen erhebliche Mengen chimärer T-Zellen generieren. Dies ist insbesondere angesichts des Durchschnittsalters der Patienten von 5-Jahren relevant⁹, zumal eine stabile Antitumorantwort wiederholte Infusionen chimärer T-Zellen *nach* der Chemotherapie erfordern dürfte^{223 287}.

Drittens besteht keine HLA-Abhängigkeit wie bei Vakzinierung mit Peptiden. Vielmehr ist jeder Patient grundsätzlich mit dem gleichen chimären Rezeptor therapierbar, sofern ein RMS fAChR exprimiert. Tatsächlich sind fast alle RMS primär fAChR-positiv und zeigen eine stärkere und homogenere fAChR-Expression nach Chemotherapie²²³.

Viertens ist anders als bei der Vakzinierung mit komplexen Autoantigenen durch die Verwendung chimärer T-Zellen kein „*Antigen-spreading*“ zu erwarten. Chimäre T-Zellen gegen den fAChR erzeugen keine Autoimmunität, während man selbst bei Vakzinierung mit der AChR γ -UE die Auslösung einer *Myasthenia gravis* befürchten müsste, da die verschiedenen UE stark homolog sind und es nach Vakzinierung gegen die γ -UE zur Autoimmunisierung gegen fAChR unspezifische Epitope, auch der α -, β - oder δ -UE, kommen könnte²⁸⁸.

Vorexperimente mit einem chimären Antigenrezeptor gegen den fAChR waren vielversprechend²²³, zeigten aber im Vergleich zu anderen chimären T-Zellmodellen eine verhältnismäßig geringe Zelllyse, die u.a. auf Resistenzmechanismen zu beruhen schien^{289 290}.

Hauptziele der vorliegenden Arbeit waren daher die Optimierung der adoptiven Immuntherapie von RMS mithilfe verbesserter chimärer T-Zellen und die Aufdeckung vermuteter Resistenzmechanismen von RMS gegen eine solche Immuntherapie.

Strategie: Um der molekularen Heterogenität der RMS *in vivo* Rechnung zu tragen, wurden sechs verschiedene RMS-Zelllinien verwendet, die den molekularen Hauptgruppen der RMS entsprachen: Translokations-positive (CRL2061, RH30, RH41) und translokations-negative ARMS (FLOH1) sowie ERMS (RD6, TE671). Außerdem spiegelten diese Zelllinien die *in vivo* zu beobachtende sehr variable Expression des fAChR wider, die im Falle von CRL2061 und RH30 gering, bei RH41, RD6 und TE671 mäßig stark, sowie bei FLOH1 stark ausgeprägt war (Abbildung 3.2). Umgekehrt wurde die „*In-vivo-Relevanz*“ der in Zelllinien exprimiert gefundenen Proteine an nativen oder Paraffin-eingebetteten Tumorgeweben von RMS-Patienten überprüft und mit adulter Skelettmuskulatur verglichen¹¹.

4.2 Verbesserung vorbekannter chimärer T-Zellen mit fAChR-Spezifität

Die Aktivität des in den Vorarbeiten verwendeten chimären Antigenrezeptors (CAR) gegenüber RMS-Zelllinien war schwach²²³. Rezeptoren der „ersten Generation“ sind für die Erkennung und Bindung des Target-Antigens zwar ausreichend²⁹¹, gewährleisten allerdings nicht die vollständige Aktivierung der chimären T-Zellen und weisen so oftmals eine ineffiziente Antitumor-Antwort auf²⁹². Ursache hierfür sind fehlende kostimulatorische Signale, die in der Regel von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) zur Verfügung gestellt

werden^{293 294}. Dazu gehören die Kostimulatoren B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die über die Bindung an den CD28-Rezeptor auf den T-Zellen die Proliferation induzieren und das Überleben der T-Zellen garantieren. Die wenigsten Tumorzellen, ebenso wie auch RMS-Zellen (Abbildung 3.14), exprimieren die benötigten Kostimulatoren, sodass bei chimären T-Zellen der ersten Generation Toleranzmechanismen (Anergie) aktiviert werden können^{290 295 296}. Durch den rekombinanten Einbau einer Liganden-unabhängigen, kostimulatorischen Domäne bei Rezeptoren der zweiten Generation wird dieses Problem behoben^{191 290 297} und führt gleichzeitig zu einer verbesserten Überlebensrate der chimären T-Zellen²⁹⁸. In der ersten Phase dieser Arbeit wurden daher zwei anti-fAChR-Rezeptoren kloniert, die einem chimären Antigenrezeptor der ersten bzw. zweiten Generation entsprachen. Durch die Verwendung eines humanen Autoantikörperfragments mit Spezifität für den fAChR, weist der chimäre Rezeptor eine vollständig humane Sequenz auf²⁴⁴. Dieses Design sollte hinsichtlich einer zukünftigen *In-vivo*-Anwendung der Entwicklung einer Immunität gegen den chimären Rezeptor vorbeugen. Eine solche anti-CAR Immunität ist eine typische Komplikation bei Verwendung muriner Autoantikörperfragmente in chimären Rezeptoren²⁹⁹ und verhindert eine längerfristige wiederholte Applikation chimärer T-Zellen, wie sie gerade bei soliden Tumoren erforderlich sein dürfte³⁰⁰⁻³⁰².

Um die Funktionalität der neuen chimären Rezeptoren zu überprüfen, wurden die Aktivierbarkeit der vom Rezeptor ausgelösten Signalkaskade (entsprechend der T-Zellaktivierung) und die Spezifität des chimären Rezeptors als unabhängige Eigenschaften getestet.

Die maximale *Aktivierbarkeit* der rezeptorabhängigen Signalkaskade (unabhängig von der Bindungsaffinität) wurde mithilfe eines anti-humanen IgG-Antikörper überprüft, der an die extrazelluläre IgG-Domäne des CAR bindet, bei intaktem Signaltransduktionsweg die Zellen zur IFN γ -Sekretion stimuliert und als Maß für die Aktivierung normaler und chimären T-Zellen gilt^{249 294}. Die Rezeptoren beider Generation zeigten dabei eine, von der Konzentration des stimulierenden anti-IgG-Antikörpers abhängige IFN γ -Ausschüttung (Abbildung 3.5) als Ausdruck einer intakten Signalkaskade. Die Tatsache, dass es durch die Einführung einer kostimulatorischen Domäne zu einer verstärkten IFN γ -Sekretion kommt, wurde bereits in vergleichbarem Maße in anderen Arbeiten beobachtet¹⁹⁰ und stellt ein physiologisches Phänomen dar, dass nicht auf rekombinante Immunrezeptoren begrenzt ist¹⁹². Die *Spezifität der Bindung* des CAR an den fAChR wurde durch mehrere Experimente bestätigt: Erstens wurde der fAChR-spezifische Teil des CAR (also das scFv35-Fragment) mit dem Fc-Teil eines Antikörpers ligiert und die Bindung des scFv35-Fc-Fusionsproteins an

fAChR-positive (RMS-Zelllinien) und fAChR-negative Zelllinien (HEK, HeLa, RH1) untersucht, wobei durchflusszytometrisch nur eine Bindung an RMS-Zellen erkennbar war (Abbildung 3.2). Zweitens wurde die fAChR-negative Zelllinie 293T mit den verschiedenen fAChR-Untereinheiten transfiziert und mit chimären T-Zellen kokultiviert, wobei wiederum nur fAChR-tragende 293T-Zellen effektiv lysiert wurden. Die Effektivität der RMS-Zelllyse war bei der Verwendung des „CD28-CD3 ζ “-CAR um 25 - 40% höher, als für den „CD3 ζ -only“-CAR (Abbildung 3.6). Eine vergleichbar gesteigerte Lyserate bei der Verwendung des „CD28-CD3 ζ “-CAR und eine bis zu 10-fach gesteigerte IFN γ -Sekretion bestätigte sich bei den meisten ARMS-Zelllinien, während die Wirkung gegenüber den beiden ERMS-Zelllinien kaum verbessert wurde (Abbildung 3.7). Diese bemerkenswerte Resistenz gegenüber chimären T-Zellen der zweiten Generation kann bei den beiden ERMS-Zelllinien nicht mit einer geringeren fAChR-Expressionsstärke erklärt werden, die bekanntermaßen einen Einfluss auf die „killing“-Effizienz²²³ und die Aktivierung²⁴⁷ chimärer T-Zellen hat. Vielmehr zeigte sich, dass RH30 Zellen trotz einer fAChR-Expression, die der von CRL2061 Zellen vergleichbar ist (Abbildung 3.2), eine viel geringere Aktivierung (IFN γ -Sekretion) der chimären T-Zellen auslösten, wohingegen eine Resistenz bei den ERMS-Zellen *trotz* starker IFN γ -Sekretion zu beobachten war (Abbildung 3.7), was auf unterschiedliche Resistenzmechanismen bei RH30 und ERMS-Zellen hinweist (s. unten). Eine solche Heterogenität der Interaktion zwischen T-Zellen und RMS-Zellen ist bisher nicht beschrieben worden.

4.3 Vergleich von chimären T-Zellen und NKT/CIK-Zellen

Vor dem Hintergrund der beobachteten nur mäßigen zytotoxischen Wirkung fAChR-spezifischer chimärer T-Zellen wurden vergleichend auch CIK-Zellen mit dem chimären Rezeptor ausgestattet. CIK-Zellen stellen eine heterogene Zellpopulation dar, die sowohl T-Zell- als auch NK-Zellcharakteristika in sich vereinen und die Tumorzellen über einen TCR-unabhängigen Mechanismus lysieren^{231 303}. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine Subpopulation von Typ II NKT-Zellen³⁰⁴, die bisher nur wenig untersucht sind³⁰⁵. Die NKT-Zell-vermittelte Zytotoxizität ist dabei weniger MHC-I/MHC-II abhängig als vielmehr auf die Erkennung von Lipid- bzw. Glykolipid-Antigenen beschränkt, wie sie dem nativen Immunsystem entspricht^{306 307306 307}. Die genauen Mechanismen, welche die Tumorerkennung und -lyse vermitteln sind weder für Typ II NKT-Zellen, noch CIK-Zellen vollständig verstanden²⁵¹. Tatsache ist jedoch, dass CIK-Zellen gegenüber Lymphomen eine effektive anti-Tumor Wirkung gezeigt haben, die kürzlich auch für RMS-Tumore *in vitro* und

in vivo beobachtet wurde^{231 308}. Ein Großteil der Veröffentlichungen charakterisiert CIK-Zellen lediglich über eine CD3/CD56-Expression, sodass die im Verlauf der Arbeit isolierten Mischpopulationen aus CD3⁺CD56⁺CD16⁻ CIK-Zellen und CD3⁺CD56⁺CD16⁺ NKT-Zellen vermutlich den beschriebenen CIK-Populationen entsprechen.

In Vorversuchen wurden RMS-Zellen von nativen, *ex vivo* isolierten NKT/CIK-Zellen deutlich besser lysiert als von *ex vivo* isolierten, nicht-transduzierten zytotoxischen T-Zellen, die zur Erzeugung chimärer T-Zellen verwendet wurden. Besonders die beiden ARMS-Zelllinien RH41 und FLOH1 sprachen gut auf native NKT/CIK-Zellen an (Abbildung 3.10). Die beobachteten Zelllyseraten waren dabei vergleichbar mit den bei RMS-Zellen bereits beobachteten Lyseraten²³¹, allerdings in keinem Fall besser als die mit den chimären T-Zellen erreichte Lyserate. Die Ausstattung von NKT-Zellen mit dem chimären Rezeptor war daher naheliegend, um möglicherweise noch wirksamere Effektorzellen zu generieren.

Tatsächlich erwiesen sich chimäre NKT-Zellen sowohl im Vergleich zu nativen NKT/CIK-Zellen als auch gegenüber chimären T-Zellen als wesentlich effektiver. Bei einem Effektor:Targetverhältnis von 2,5:1 zeigten chimäre NKT/CIK-Zellen gegenüber chimären T-Zellen eine bis zu 100% gesteigerte Lyserate, wobei sich allerdings auch bei NKT/CIK-Zellen ein ausgeprägt heterogenes Ansprechen der verschiedenen RMS-Zelllinien feststellen ließ. Bei den als Kontrolle mitgeführten 293T-Zellen wurde mit den rezeptortragenden NKT/CIK-Zellen hingegen keine verstärkte Zelllyse beobachtet, was die Spezifität des Rezeptors bestätigt (Abbildung 3.10).

Zusammenfassend legen die Ergebnisse dieses Pilotprojektes den Schluss nahe, dass NKT/CIK-Zellen als Ausgangspopulation für die Generierung zytotoxischer, chimärer Effektorzellen gegen RMS weiter untersucht werden sollten. Wegen der besseren Verfügbarkeit von T-Zellen wurden die folgenden Untersuchungen mit T-Zellen fortgesetzt.

4.4 Resistenzmechanismen von RMS-Zellen gegenüber chimären T-Zellen

Das unterschiedliche Ansprechen verschiedener RMS-Zelllinien gegenüber chimären T- und NKT/CIK-Zellen trotz ähnlicher fAChR-Expression warf die Frage auf, welcher Resistenzmechanismen sich RMS-Zellen gegen einen T-Zell-induzierten Zelltod (*immune escape*) bedienen. Im Folgenden wird die Rolle immunsuppressiver Koinhibitoren²⁵⁹, eine mangelhafte Granzym-vermittelte SMAC-Aktivierung³⁰⁹ und die Expression antiapoptotischer Moleküle^{126 303} diskutiert.

4.4.1 MHC, Kostimulatoren und immunsupprimierende Oberflächenmoleküle

Neben der Antigen (Peptid)-spezifischen Interaktion zwischen zytotoxischen T-Zellen und Zielzellen, haben antigenunabhängige Oberflächenmoleküle mit aktivierender oder inhibitorischer Funktion eine entscheidende Bedeutung für den Ausgang der Interaktion zwischen zytotoxischen T-Zellen und Tumorzellen^{310 311}.

Da zu Beginn dieser Arbeit wenig über „*immune escape*“-Mechanismen auf der Basis der Expression von MHC und anderen immunregulatorischen Molekülen bei RMS bekannt war^{43 185}, wurden diese im Verlauf der Arbeit untersucht und hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Zytotoxizität fAChR-spezifischer chimärer T-Zellen analysiert. Als Vergleichsgewebe bei den Expressionsanalysen diente normale Skelettmuskulatur, die eine Vielzahl positiver und negativer Immunregulatoren exprimiert¹⁶⁴.

4.4.1.1 MHC-I und MHC-II

Obwohl für die Funktion chimärer T-Zellen nicht relevant, wurde die Expression klassischer, polymorpher MHC-I- und MHC-II-Moleküle von RMS betrachtet, da deren Herabregulation die Erkennung durch natürliche zytotoxische T-Zellen (etwa im Rahmen von Vakzinierungstherapien) verhindern kann^{42 43}. Kultivierte unreife Myoblasten zeigen eine konstitutive HLA-A, -B und -C Expression, die durch proinflammatorische Zytokine wie IFN γ , TNF α oder IL-1 α zusätzlich induzierbar ist^{160 312 313}. Mit Ausnahme der ARMS-Zelllinie CRL2061 wurde auch bei den RMS-Zelllinien eine ausgeprägte MHC-I-Expression nachgewiesen, ebenso wie bei den untersuchten ERMS-Frischgeweben, die sich somit nicht von Muskeln unterscheiden (Abbildung 3.12). Die molekulare Ursache für die fehlende Expression bei CRL2061 ist unklar und wurde hier nicht weiter untersucht. Allerdings könnte das Expressionsmuster der Zelllinie, als Vertreter für ARMS, auf eine heterogene MHC-I-Expression schließen lassen und damit einen „*escape*“-Mechanismus bei einigen ARMS-Tumoren darstellen^{42 43}. Weiterführende Analysen an ARMS-Biopsien werden zur Klärung erforderlich sein.

Anders als die MHC-I-Expression ist eine MHC-II-Expression erst in späten Differenzierungsstadien von Myoblasten und bei reifen Myotuben durch IFN γ induzierbar und beschränkt sich auf HLA-DR, während HLA-DQ und -DP bisher nicht nachgewiesen wurden^{160 313}.

So ist es nicht verwunderlich, dass bei den im Proliferationsmedium wachsenden, gering differenzierten RMS-Zellen eine MHC-II-Expression weder konstitutiv noch nach IFN γ - oder TNF α -Induktion detektierbar war. Pathologisch war hingegen, dass im Vergleich zu normalen

Myoblasten/Myotuben auch im Hunger bzw. Differenzierungsmedium alle RMS-Zelllinien mit Ausnahme der ARMS-Zelllinie FLOH1 keine HLA-DR-Induzierbarkeit durch IFN γ zeigten (Abbildung 3.11). Die Gründe für die erstmals beschriebene Sonderstellung der FLOH1 Zelllinie sind bisher unklar.

Während die Expression klassischer MHC-I- und MHC-II-Moleküle keinen Einfluss auf die Zytotoxizität chimärer T-Zellen hat, kann die Expression des nicht-klassischen MHC-I-Moleküls HLA-G die Wirkung zytotoxischer T-Zellen und NK-Zellen vermindern. Die immunmodulatorische Wirkung erfolgt hierbei durch Interaktion mit inhibitorischen Rezeptoren wie ILT-2, ILT-4 oder p49 auf lymphoiden Effektorzellen^{170 171 314 315}. Im Vergleich zu den untersuchten Muskeln war die HLA-G-Expression bei RMS-Tumoren und RMS-Zelllinien schwächer ausgeprägt (Abbildung 3.13) und dürfte daher für die relativ geringe zytotoxische Wirkung der chimären T-Zellen eher keine Rolle spielen. Da alle Zelllinien überdies ein ähnliches HLA-G-Expressionsniveau zeigten, ist HLA-G auch für die beobachtete unterschiedliche Zelllyserate nicht ausschlaggebend. Zusammenfassend ist ein, auf Fehlregulation von MHC-Molekülen beruhender „*escape*“-Mechanismus bei RMS somit wenig wahrscheinlich.

4.4.1.2 Kostimulatoren: B7.1, B7.2 und B7H2

Die Ausstattung chimärer Antigenrezeptoren mit einer kostimulatorischen Domäne gehört mittlerweile zum Standardaufbau dieser Rezeptoren und dient einer Korezeptor-unabhängigen Aktivierung der chimären T-Zellen²⁹⁶. Welche Bedeutung die kostimulatorische CD28-Domäne für die fAChR-spezifischen T-Zellen hat, wird durch die maßgebliche Aktivitätssteigerung der chimären T-Zellen deutlich. Für die geringe Effektivität der ersten Rezeptorgeneration²²³ ist vermutlich die fehlende Expression der beiden klassischen Kostimulatoren B7.1 und B7.2 verantwortlich, die weder bei den untersuchten Zelllinien noch Geweben dokumentiert werden konnten (Abbildung 3.14 und 3.15). Ähnlich wie im Falle kultivierter Myoblasten¹⁶⁷ war die Expression von B7.1 und B7.2 bei RMS-Zelllinien durch IFN γ oder TNF α nicht induzierbar (Abbildung 3.29).

Im Gegensatz zu B7.1 und B7.2 wurde die Expression des nicht-klassischen Kostimulators B7H2 (ICOS-L), bei einem Großteil der RMS-Zelllinien und RMS-Geweben nachgewiesen (Abbildung 3.14 und 3.15). Bisher war dies nur für TE671 ERMS-Zellen bekannt¹⁶⁶. Ein ebenfalls neuer Befund war die auf RH41 Zellen beschränkte Induzierbarkeit der ICOS-L-Expression durch TNF α (Abbildung 3.29).

Die Interaktion von ICOS-L mit ICOS auf aktivierten T-Zellen kann eine CD4 und CD8 T-Zell-Antwort stimulieren¹⁶⁴. Bei normalen Muskelzellen scheint ICOS-L unter inflammatorischen Bedingungen die Rolle der beiden klassischen Korezeptoren zu übernehmen, wodurch Muskelzellen als nicht-professionelle APC agieren und im Rahmen einer Myositis letztlich zerstört werden können^{166 169}. Bei RMS ist die Rolle von ICOS-L bisher unbekannt, aber aus zwei Gründen untersuchungswürdig: zum einem führt ICOS-L bei Melanomen zur Rekrutierung regulatorischer T-Zellen und Suppression der anti-tumoröse Immunantwort³¹⁶, zum anderen zeigte sich in unseren Untersuchungen eine negative Tendenz zwischen ICOS-L Expression und dem Überleben von Patienten mit ARMS (Abbildung 3.16). Diese Befunde sollten an einer unabhängigen Patientenkohorte überprüft werden.

4.4.1.3 Adhäsionsmoleküle: CD54 (ICAM) und CD56 (NCAM)

Die Interaktion von Immunsystem und humaner Skelettmuskulatur bei inflammatorischen Myopathien wird durch die Expression von Adhäsionsmolekülen (*cell adhesion molecules*, CAM), wie CD54 (*intra-cell adhesion molecule*, ICAM-1), CD56 (*neural-cell adhesion molecule*, NCAM-1) LFA-1 und Sialyl-LewisX, unterstützt^{160 162}. Von Myoblasten wird CD56 *in vitro* spontan, CD54 nach Induktion mit IFN γ exprimiert. Die CD56-Expression in RMS-Biopsien wurde bereits früher beschrieben³¹⁷ und hier bei allen getesteten RMS-Zelllinien und Geweben bestätigt (Abbildung 3.17 und 3.18). Aufgrund der gleichmäßig starken Expression bei fast allen RMS-Zelllinien kommt CD56 als Ursache der unterschiedlichen Zelllyseraten durch die chimären (CD56-negativen) T-Zellen kaum infrage. Da die CD56-vermittelte Adhäsion über eine homotypische CD56-CD56 Bindung erfolgt³¹⁸, könnte es allerdings sein, dass die höhere Zytotoxizität CD56-positiver chimärer NKT/CIK-Zellen im Vergleich zu chimären T-Zellen (Abbildung 3.10) mit der CD56-Expression auf RMS-Zellen zusammenhängt. Entsprechende Experimente mit CD56-blockierenden Antikörpern könnten diese Fragestellung näher beleuchten.

Anders als CD56 wurde CD54 nur von der ARMS-Zelllinie CRL2061 exprimiert. Eine CD54-Induktion *in vitro* war, im Gegensatz zu humanen Myoblasten, weder durch Zugabe von IFN γ noch TNF α möglich¹⁶². RMS-Gewebe zeigten eine heterogene Expression, die – wie von Xiong *et al.* gerade beschrieben³¹⁹ – zwischen negativ und schwach schwankte (Abbildung 3.19). Die transkriptionellen Expressionsdaten und die Chemokin-Analyse von vier ERMS-Biopsien ließen allerdings eine wesentlich stärkere Proteinexpression vermuten,

als bei den untersuchten Paraffingeweben immunhistochemisch nachgewiesen wurde (Abbildung 3.19). Die Analyse der Überlebensdaten erbrachte zudem eine positive Korrelation zwischen CD54-Expression und Überleben bei ERMS-Patienten (Abbildung 3.20), eine Beobachtung, die auch schon bei diversen anderen Tumoren gemacht worden war^{320 252 254}, während ARMS-Patienten mit steigender CD54-Expression zu einem schlechteren Verlauf tendierten (nicht signifikant). Diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse lassen vermuten, dass RMS-Tumore neben der membrangebundenen auch die lösliche CD54 (s-CD54; s-soluble)-Variante bilden. Hohe s-CD54 Serumlevel korrelieren bei Melanomen³²¹, Colon-^{257 322}, Magen-³²³ und Mammakarzinomen³²⁴ sowie Lymphomen²⁵⁶ mit einer schlechten Prognose und einem aggressiveren Phänotyp. Als Mechanismus wird vermutet, dass die Bindung von s-CD54 an das Leukozyten-Integrin LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen*) das Anlagern der Lymphozyten an Endothelzellen verhindert³²⁵ und gleichzeitig bei den Endothelzellen zur Aktivierung von Signalkaskaden führt, welche die Angiogenese induzieren³²⁶. Dadurch wird die Rekrutierung von Lymphozyten in den Tumor minimiert und die Tumorangiogenese verstärkt. Aufgrund fehlender Serumproben von RMS-Patienten konnten wir die s-CD54-Spiegel nicht bestimmen, die bisher in nur einer Arbeit mit geringer Fallzahl und ohne subtypenspezifische Unterscheidung untersucht wurden³²⁷. Daher erscheinen Untersuchungen zur Rolle von s-CD54 als prognostischer und evtl. prädiktiver Biomarker (z.B. im Hinblick auf anti-angiogenetische Strategien) sinnvoll. Demgegenüber wurde die potenzielle Relevanz des *membrangebundenen* CD54 in der vorliegenden Arbeit durch Transfektionsexperimente analysiert. Diese zeigten erstmals, dass die CD54-Neoexpression auf der Zellmembran ursprünglich CD54-negativer RMS-Zellen die Zelllyse sowohl durch fAChR-spezifische T-Zellen als auch durch unspezifische NKT/CIK-Zellen steigert (Abbildung 3.22 und Abbildung 3.23). Die Zytolyse der konstitutiv CD54-positiven ARMS-Zelllinie CRL2061 wurde durch chimäre T-Zellen und NKT-Zellen nach CD54-Hyperexpression nicht verändert. Ob CD54-transfizierte RMS-Zelllinien gleichzeitig die lösliche Variante bilden und inwieweit deren Sekretion chimäre T-Zellen hemmt, müssen weitere Analysen klären. Ebenso wird es interessant sein, die differentielle Expression der CD54-Splice-Varianten hinsichtlich der unterschiedlichen Prognose von ARMS und ERMS zu analysieren.

4.4.1.4 Immunsupprimierende Oberflächenmoleküle: B7H1 und B7H3

Immunsupprimierende Oberflächenmoleküle bei Tumorzellen nehmen bei der Tumorentstehung, Progression und Resistenz eine zentrale Rolle ein. Die Expression dieser

Faktoren führt meist zu einer gestörten Interaktion von Immun- und Tumorzellen oder wirkt sich hemmend auf die Aktivität tumorinfiltrierender Lymphozyten aus. Immunsupprimierende Oberflächenmoleküle, welche die Interaktion von Muskulatur und Immunsystem bei inflammatorischen Myopathien modulieren sind die B7-Homologe B7H1 und B7H3^{66 328}. Beide Oberflächenmoleküle wurden bisher nur bei der ERMS-Zelllinie TE671 beschrieben^{66 328}, was in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte (Abbildung 3.24).

Die B7H1-Expression war auf den verschiedenen RMS-Linien sehr heterogen und am stärksten bei der ARMS-Zelllinie RH30 ausgeprägt, während eine Oberflächenexpression mittels FACS bei RH41- und FLOH1-Zellen nicht detektierbar war (Abbildung 3.24). Die quantitative Bestimmung der B7H1-mRNA an RMS-Geweben ergab im Vergleich zu Skelettmuskulatur nur für ARMS eine signifikante Expressionssteigerung.

In der Regel wird B7H1 (auch PD-1L genannt) auf professionellen APCs exprimiert und verhindert durch Bindung an seinen Rezeptors PD-1 auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Monozyten überschießende Immunantworten^{164 178 329}. Bei Tumorzellen ist die Expression von B7H1 ein verbreiteter „*escape*“-Mechanismus, der zu verminderter Proliferation, eingeschränkter Zytokinsekretion (Anergie) und Apoptose aktivierter Effektorzellen führt^{178 259 330} und bei vielen Tumoren mit einer schlechten Prognose assoziiert ist^{154 331-333}. Bei RMS fehlen entsprechende Untersuchungen.

Die besonders starke B7H1-Expression bei der ARMS-Zelllinie RH30 (Abbildung 3.24) könnte jedoch eine Erklärung für die geringe IFN γ -Sekretion sein, die nach der Kokultivierung von chimären T-Zellen und RH30-Zellen beobachtet wurde (Abbildung 3.7). Entsprechend dieser Hypothese wird es interessant sein zu sehen, ob eine B7H1-Blockade auf RMS-Zellen die Effektivität chimärer T-Zellen ähnlich verbessern kann, wie dies bei Plattenepithelkarzinomen beobachtet wurde³³⁴.

Andererseits wurde bei Melanomen gezeigt, dass B7H1 zur Expression von PD-1 auf Tumor infiltrierenden Lymphozyten führt und langfristig die Anti-Tumor Antwort hemmen kann³³⁵. Über die Faktoren die eine PD-1 Expression induzieren wird zurzeit noch spekuliert. Unter welchen Bedingungen PD-1 von chimären T-Zellen nach Kokultur mit RMS-Zellen exprimiert wird, wurde hier nicht weiter untersucht.

Neben einer heterogenen B7H1-Expression zeigten RMS-Zelllinien durchweg eine verstärkte B7H3-Expression, die auch bei ERMS-Biopsien nachgewiesen wurde (Abbildung 3.24 und 3.25). Die Rolle des B7H3-Moleküls konnte bisher nicht restlos aufgedeckt werden: es scheint aber an Zellmigration und Invasion³³⁶ ebenso beteiligt zu sein, wie einen

inhibitorischen Einfluss gegenüber aktivierten T-Lymphozyten zu haben³⁹. Bei Lungenkarzinomen und Glioblastomen korreliert die B7H3-Expression mit einer höheren Metastasierungsneigung und Malignität^{337 338}. Waschbisch *et al.* konnten zeigen, dass ein spezifischer „*knock down*“ mit B7H3-siRNA die T-Zell-vermittelte Lyse der RMS-Zelllinie TE671 verbessern konnte⁶⁶. Eine Reproduktion der Ergebnisse war bisher nicht möglich, da der „*knock down*“ mit siRNA nur unzureichend gelang, sodass lediglich eine Tendenz hin zu einer effektiveren Zelllyse erreicht werden konnte (Abbildung 3.27). Die Herstellung und Verwendung von shRNA könnte einen dauerhaften „*knock down*“ induzieren und damit verlässlichere Ergebnisse liefern, als dies mit der transienten siRNA möglich ist.

4.5 Resistenzmechanismen, die die Apoptose-Induktion bei RMS beeinträchtigen können

Im ersten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass RMS-Zellen durch chimäre Effektorzellen eliminiert werden, ohne auf die Mechanismen der Zytolyse einzugehen. In Vorarbeiten wurde die Hypothese geäußert, dass von aktivierten chimären T-Zellen stammendes IFN γ für die Induktion des Zelltods von RMS verantwortlich sei²²³. IFN γ kann außerdem die Expression einiger oben untersuchter, immunologisch relevanter Oberflächenproteine modifizieren und die Expression des fAChR in myogenen Zellen steigern²⁶⁰, was die lytische Aktivität fAChR-gerichteter chimärer T-Zellen erhöhen könnte. Daher wird hier die IFN γ -Wirkung auf Proliferation, Apoptose und Target-Gene in RMS-Zellen diskutiert.

4.5.1 IFN γ

In *funktioneller* Hinsicht war durch IFN γ nur bei RH30-Zellen der Zelltod auslösbar, der aber im Vergleich zu den IFN γ -sensitiven HT29-Karzinomzellen gering ausfiel (Abbildung 3.30). Da im Gegensatz zu den apoptotischen HT29-Zellen bei RH30 keine Spaltung der Caspase 8 beobachtet wurde, handelte es sich vermutlich vorrangig um nekrotische Zellen. Demgegenüber war bei CRL2061 und RH41 ARMS-Zellen durch IFN γ nur ein anti-proliferativer Effekt, und in FLOH1, RD6 und TE671 weder eine proapoptotische noch proliferationshemmende Wirkung erkennbar (Abbildung 3.30 und 3.31).

Parallel zu diesen geringen funktionellen Effekten ergab die Expressionsanalyse der IFN γ -Target-Gene MHC-I, MHC-II und AChR, dass IFN γ bei allen untersuchten RMS-Zelllinien nur minimale Veränderungen auf RNA-Niveau und keine erkennbare Steigerung auf

Proteinebene bewirkte (Abbildung 3.28). Von dieser transkriptionellen Hemmung war auch der negative Regulator SOCS-1 (*suppressor of cytokine signaling*)³³⁹ betroffen.

Aufgrund der unerwartet geringen Sensitivität der RMS-Zelllinien gegenüber IFN γ und dessen Bedeutung bei der Tumorentstehung im Rahmen des Tumor *Immunoediting*⁴⁹, wurde der IFN γ -Signaltransduktionsweg bei RMS-Zellen näher untersucht.

Die IFN γ -Rezeptoren (IFNGR) 1 und 2, deren Expressionsniveau als limitierender Faktor der Signaltransduktion beschrieben wurde²⁶², zeigten jedoch in allen RMS-Zelllinien eine etwa gleiche Expression wie in IFN γ -sensitiven HT29-Zellen (Abbildung 3.32). Mutationen fanden sich in keiner der wesentlichen, funktionellen Domänen von IFNGR1 und die Phosphorylierung des IFN γ -abhängigen Transkriptionsfaktors STAT-1 war regelhaft (Abbildung 3.33)²⁶⁴.

Diese Befundkonstellation legte die Möglichkeit einer epigenetischen Regulation nahe, zumal die Promotormethylierung des MHCII-Transaktivators CIITA eine typische Ursache defekter, IFN γ -resistenter MHCII-Expression ist³⁴⁰ und kürzlich auch die gestörte Zellzykluskontrolle bei RMS auf epigenetische Mechanismen zurückgeführt wurde³⁴¹. Unsere Demethylierungsversuche mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5' Aza) konnten bei RMS-Zellen allerdings weder die MHC-II- noch die AChR-Expression induzieren (Abbildung 3.36), was anderen Autoren erst durch kombinierte Behandlung mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HADAC) und 5' Aza gelang³⁴². Ob alle Promotoren der untersuchten IFN γ -Target-Gene einer epigenetischen Regulation unterliegen, ist bisher unklar, zumal auch andere Faktoren (CaMKII³⁴³ und miRNAs³⁴⁴) die transkriptionelle, post-transkriptionelle und post-translationelle Stabilität von MHC-II- und anderen IFN γ -Target-Genen regulieren. Ebenfalls unbekannt ist, ob RMS *in vivo* unterschiedliche IFN γ -Resistenzen aufweisen (wie die hier verwendeten Zelllinie), und ob diese Variabilität Bedeutung für die klinische Aggressivität von RMS hat, wofür Mausmodelle anderer Tumoren sprechen^{62 345-348}. Demgegenüber zeigen die vorliegenden Ergebnisse klar, dass die Apoptose-Induktion durch chimäre T-Zellen bei RMS-Zelllinien ein IFN γ -unabhängiger Prozess ist.

4.5.2 Resistenz von RMS gegenüber extrinsischer Apoptose-Induktion durch Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie

Zu den Stimuli, welche die „extrinsische Apoptose“ induzieren und an der T-Zell-vermittelten Lyse von RMS beteiligt sein könnten, gehören FAS-L, TNF α und TRAIL (*TNF related apoptosis inducing ligand*)³⁴⁹.

TRAIL ist für die natürliche Tumorüberwachung (*immune surveillance*) essentiell und im vorliegenden Kontext besonders interessant, weil es speziell die Apoptose von Tumorzellen durch zytotoxische T- und NK-Zellen induziert³⁵⁰⁻³⁵² und bereits klinisch getestet wird³⁵³⁻³⁵⁵. Mit Ausnahme der beiden ERMS-Zelllinien RD6 und TE671 wurde bei allen RMS-Zelllinien durch TRAIL eine Tumorzelllyse nachgewiesen, die mit einer Caspase 8-Spaltung einherging (Abbildung 3.37), aber auch nach 48-stündiger Inkubationszeit inkomplett war (20-50% überlebende Zellen) (Abbildung 3.37 A). RD6 und TE671 ERMS-Zellen waren sogar völlig resistent. Die größere TRAIL-Resistenz der ERMS verglichen mit den ARMS-Zelllinien korreliert gut mit der stärkeren Resistenz der ERMS-Linien gegenüber chimären T-Zellen *in vitro*. Eine direkte Beteiligung von TRAIL an der Zytolyse von RMS durch chimäre T-Zellen muss aber erst noch geklärt werden (z.B. durch Verwendung TRAIL-blockierender Antikörper). Die TRAIL-Resistenz von Tumorsubpopulationen ist in mechanistischer Hinsicht ebenfalls unklar, wird aber wegen ihrer Bedeutung für Tumorrezidive eingehend untersucht³⁵⁶.

Wie im Falle der TRAIL-induzierten Apoptose wurde auch eine verminderte Sensitivität gegenüber FAS-L als pathogenetischer Faktor bei der Tumorentstehung beschrieben^{93 357}. FAS-L wird ebenfalls von aktivierten T- und NK-Zellen exprimiert und induziert Apoptose geschädigter und Virus-infizierter Zellen¹⁰⁰. Im Gegensatz zu TRAIL ist die therapeutische Anwendung von FAS-L aufgrund hoher Lebertoxizität allerdings nicht möglich^{358 359}. Darüber hinaus wären die RMS-Zelllinien auch keine Kandidaten für eine FAS-L Therapie, da alle Linien völlig resistent waren. Dies beruhte auf einer fehlenden FAS-Rezeptor-Expression (Abbildung 3.38), die bereits aus anderen Zellsystemen bekannt ist³⁶⁰ und durch IFN γ -Stimulation auch nicht überwindbar war³⁶¹ (nicht gezeigt). Eine Beteiligung von FAS-L an der chimären T-Zell-vermittelten Apoptose von RMS-Zellen ist somit auszuschließen. Die kombinierte Resistenz von Tumoren gegenüber IFN γ und FAS-L wurde in einem Mausmodell bereits mit einer höheren Metastasierungsneigung und einem aggressiveren Phänotyp in Verbindung gebracht³⁶², den es auch für RMS noch zu untersuchen gilt.

Des Weiteren wurde TNF α als Auslöser der extrinsischen Apoptose untersucht⁹¹. Auch dabei zeigten alle RMS-Zelllinien eine Apoptose-Resistenz und lediglich RH41 ARMS-Zellen reagierten auf hohe TNF α -Dosen mit verlangsamtem Wachstum (Abbildung 3.39). Die zugrunde liegenden Resistenzmechanismen wurden nicht weiter untersucht.

4.5.3 Resistenz von RMS gegenüber intrinsischer Apoptose-Induktion

Angeichts der weitgehenden Resistenz gegenüber Stimulatoren der extrinsischen Apoptose wurden RMS-Zelllinien und Gewebe im nächsten Schritt bzgl. der Expression pro- und antiapoptotischer Moleküle der *intrinsischen* Apoptose-Kaskade untersucht. Verschiedene antiapoptotische Mechanismen wurden kürzlich in RMS-Zellen entdeckt^{363 364}. Dazu gehören die verstärkte Expression von IAPs (*inhibitors of apoptosis*: Survivin, XIAP, cIAP1 und cIAP2³⁶⁵⁻³⁶⁷) sowie von Mitgliedern der Bcl-2-Familie³⁶⁷⁻³⁷². Diese Befunde konnten teilweise bestätigt werden. Es fand sich aber eine bisher so nicht beschriebene Heterogenität der exprimierten Profile pro- und antiapoptotischer Moleküle bei den Zelllinien und RMS-Biopsien gleichermaßen (Abbildung 3.40 und 3.42).

Wegen der besonders heterogenen Expression von Mitgliedern der Bcl-2-Familie und der nur relativ geringen Zahl verfügbarer Zelllinien und Biopsien, konzentrierte sich diese Arbeit auf die homogener veränderten IAPs³⁷³. Der antiapoptotische Einfluss der IAPs beruht überwiegend auf der direkten oder indirekten Inhibierung der Caspasen 3, 6, 7 und 9³⁷⁴: XIAP hemmt besonders die proapoptotischen Proteasen und unterbricht so die mitochondrial ausgelöste intrinsische Apoptosekaskade. Demgegenüber hemmen cIAP1 und cIAP2 die Apoptose eher indirekt über eine Poly-Ubiquitinierung von Target-Genen³⁷⁵⁻³⁷⁸, wie RIP1^{91 114}, und können ihrerseits durch die natürlichen IAP-Antagonisten SMAC/DIABLO neutralisiert werden^{379 380}.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen wiesen RMS-Zelllinien und Gewebe im Vergleich zu Muskulatur eine verstärkte Expression von cIAP1, XIAP und besonders von Survivin auf (Abbildung 3.40 und 3.42). Wie für andere Tumoren bereits beschrieben³⁸¹, konnte trotz geringer Fallzahl einen Trend für eine negative Korrelation zwischen Patientenüberleben und Survivin-Expressionsniveau im jeweiligen RMS gefunden werden ($p = 0,06$) (Abbildung 3.43). Die bei einigen anderen Tumoren beobachtete prognostische Relevanz einer nukleären versus zytoplasmatischen Survivin-Expression³⁸¹⁻³⁸⁴, bestätigte sich infolge der geringen Fallzahlen allerdings nicht.

Um den funktionellen Einfluss der IAP-Mitglieder auf Proliferation und Apoptose von RMS-Zellen zu untersuchen, wurden die Zelllinien mit einem *artifiziellen* IAP-Antagonisten (SMAC-Mimetic) behandelt, der Teile der N-terminalen Sequenz des natürlichen IAP-Antagonisten SMAC (s. oben) imitiert³⁸⁵ und zum proteasomalen Abbau von cIAP1, cIAP2^{374 386} und von XIAP führen kann³⁸⁵. In den hier durchgeführten Untersuchungen löste das SMAC- *Mimetic* nur geringe proapoptotische Effekte bei RMS-Zellen aus (s. unten) und führte lediglich bei cIAP1 zu einem dauerhaften Proteinabbau, während für XIAP und

Survivin spätestens nach 6 h das ursprüngliche Expressionsniveau wieder erreicht worden war (Abbildung 3.45).

Hintergrund dieser Beobachtungen dürfte ein aus anderen Zellsystemen³⁸⁷ bekannter „*feed back*“-Mechanismus mit antiapoptotischen Folgen sein. Die Degradation von cIAP1/2 bewirkt über eine Aktivierung des NF-κB-Signalweges nämlich nicht nur eine (grundsätzlich proapoptotische) TNFα-Sekretion, sondern führt letztlich zu einer verstärkten Re-Expression von IAPs, falls die Tumorzelle in dem frühen aber kurzen IAP-defizienten Intervall keine ausreichende z.B. TNFα-getriebene Apoptose-Kaskade aufbaut^{374 385}.

Angesichts der oben beschriebenen TNFα-Resistenz fast aller RMS-Zelllinien scheint eine solche Konstellation bei den meisten RMS in der Tat vorzuliegen und könnte der Resistenz gegenüber *SMAC-Mimetics* zugrunde liegen. Im Sinne dieser Hypothese zeigten Kombinationsbehandlungen von RMS-Zellen mit *SMAC-Mimetic* und TNFα kaum Synergien (Abbildung 3.44).

Weshalb vor diesem Hintergrund die kombinierte Behandlung aus *SMAC-Mimetic* und chimären T-Zellen die Zytolyse bei der ARMS-Zelllinie FLOH1, nicht aber bei den anderen Linien verbesserte (Abbildung 3.47), war zunächst unklar. Ein Grund könnte darin liegen, dass die Behandlung mit *SMAC-Mimetic* und ebenso TNFα, IFNγ und TRAIL bei FLOH1 (und TE671) Zellen im Gegensatz zu den anderen Zelllinien nicht zur erwarteten NF-κB-getriebenen Induktion von IAPs führte, sondern cIAP1, Survivin und teilweise cIAP2 herab regulierte (Abbildung 3.48). Die molekulare Basis für diese Unterschiede zwischen FLOH1 und TE671 einerseits und den anderen Linien andererseits, ist bisher unbekannt. Ebenso unklar ist, weshalb TE671-Zellen anders als FLOH1-Zellen gegenüber „chimären T Zellen plus *SMAC-Mimetic*“ resistent sind, obwohl beide RMS-Linien unter *SMAC-Mimetic* IAPs herab regulieren. Offensichtlich können TE671 alternative antiapoptotische Mechanismen aktivieren – was die Komplexität und Heterogenität der antiapoptotischen Netzwerke bei RMS unterstreicht. Schlussfolgernd legen die gerade beschriebenen Befunde nahe, dass der therapeutische Einsatz von *SMAC-Mimetics* bei RMS wohl überlegt sein sollte, da durch die NFκB-getriebene Überexpression von IAPs Chemotherapieresistenzen erzeugt werden könnten, wie dies bei Mesotheliomen bereits beschrieben wurde³⁸⁸.

4.5.4 Survivin

Obwohl Mitglied der IAP-Familie wird Survivin in seiner Expression von *SMAC-Mimetics* nicht maßgeblich beeinflusst. In RMS-Xenotransplantatmodellen konnte gezeigt werden, dass eine Survivin-Blockade die Proliferation und Viabilität von RMS vermindert^{365 368} und die

Radiosensitivität durch Wechselwirkung mit der DNA-Reparaturapparat erhöht³⁸⁹. Survivin hemmt die Apoptose, indem es XIAP vor Ubiquitinierung³⁹⁰ und proteasomaler Degradation¹³⁷ schützt, was sich als relevant für die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität bei Hodgkin-Lymphomen erwiesen hat³⁹¹. Ob die in RMS beobachtete Survivin-Hyperexpression die Tumorzellen vor den natürlichen oder chimären zytotoxischen T-Zellen schützt, war aber unbekannt und konnte in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden: Survivin-Repression mittels siRNA und pharmakologisch mittels Celecoxib verstärkte den lytischen Effekt chimärer T-Zellen auch bei den zuvor resistenten Zelllinien, wie RD6 und TE671 (Abbildung 3.50 und 3.52). Die Wirkung des Cox-2-Inhibitors Celecoxib beruht dabei auf einer Verminderung der Survivin Protein-Stabilität^{392 393}.

Klinisch wird Celecoxib bei der Behandlung von Schmerzen aufgrund rheumathoider Arthritis³⁹⁴ und zur Prophylaxe bei Familiärer Adenomatöser Polyposis³⁹⁵ eingesetzt. Da Celecoxib auch die Anzahl von „*myeloid-derived suppressor cells* (MDSC)“ reduziert, die eine Tumor-assoziierte Immunsuppression bewirken³⁹⁶, könnte sich Celecoxib in Kombination mit chimären T-Zellen in doppelter Weise günstig auf die Behandlung von RMS auswirken: durch Förderung der Tumorzellapoptose (wie hier gezeigt) und zusätzlich durch Abschwächung der intra-tumorösen MDSC-vermittelten Immunsuppression (über die bei RMS *in vivo* bisher noch keine Untersuchungen vorliegen). Die hier aufgezeigte Strategie birgt durchaus das Potenzial in der medizinische Praxis Anwendung zu finden, da die „kleinen Moleküle“ YM155 bzw. LY2181308³⁹⁷⁻³⁹⁹ als Survivin-Inhibitor bereits in klinischen Phase I-Studien bei soliden Tumoren und Lymphomen getestet wurden und *in vivo* die Survivin-Expression reduzieren und die Tumorzellproliferation hemmen³⁹⁹.

4.6 *In-vivo*-Mausexperimente

Die Überexpression von Survivin in RMS wurde in dieser Arbeit als Mechanismus identifiziert, der *in vitro* zur Resistenz von RMS gegenüber chimären T-Zellen beitrug. Die Relevanz dieser Beobachtung wurde anhand eines xenogenen *In-vivo*-Mausmodels überprüft. Dabei zeigten tumortragende immundefiziente Mäuse zeigten nach einmaliger Injektion chimärer T-Zellen, im Vergleich zu Mäusen nach Injektion nicht-chimärer T-Zell-Kontrollen, während der ersten drei Wochen ein vermindertes Wachstum der aus RD6 ERMS-Zellen bestehenden Xenotransplantate (Abbildung 3.54). Ohne weitere Behandlung mit chimären T-Zellen verstärkte sich danach das Wachstum der Xenotransplantate, die nach zwei Wochen die gleiche Größe wie in den Kontrolltieren erreichten. Dieser transiente Effekt einer einmaligen Behandlung xenotransplantierte Mäuse mit chimären T-Zellen gleicht

weitgehend der vorübergehenden Proliferationshemmung von RMS-Xenotransplantaten während der Behandlung mit einem fAChR-spezifischen Immuntotoxin²⁸⁷, das auf dem gleichen Antikörperfragment (scFv35) basiert wie der hier verwendete chimäre Rezeptor. Auch dabei trat kurz nach dem Ende der Immunotoxinbehandlung ein aufholendes Tumorwachstum auf.

Gründe für dieses „Therapieversagen“ könnten u.a. eine reduzierte fAChR-Expression auf den RMS-Zellen, die Selektion primär fAChR-negativer Subklone oder die Entwicklung fAChR-unabhängiger Resistenzmechanismen sein, welche die Wirkung von Immunotoxin oder chimären T-Zellen beeinflussen.

Ob eine Hemmung der Survivin-Expression die Effektivität der T-Zellen *in vivo* erhöht, konnte in dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Obwohl bereits mehrere *In-vivo*-Studien mit Celecoxib durchgeführt wurden, war die Substanz für den verwendeten Mausstamm in Vorversuchen so toxisch, dass die geplanten regulären *In-vivo*-Versuche nicht durchgeführt werden konnten. Bei künftigen Experimenten sollte Celecoxib durch das weitgehend untoxische Shepherdin ersetzt werden, das die Interaktion von Hsp90 und Survivin hemmt und dadurch zum Abbau von Survivin führt⁴⁰⁰. Bei Vorexperimenten mit chimären T-Zellen und den RMS-Zelllinie wurden mit Shepherdin ähnliche Wirkungen auf die Survivin-Expression wie nach Survivin „*knock down*“ und Celecoxib-Gabe beobachtet.

4.7 Zusammenfassung und Ausblick

Vor dem Hintergrund des klinischen Bedarfs nach neuen Therapiestrategien für chemotherapierefraktäre, fast immer tödlich verlaufende Rhabdomyosarkome (RMS) war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, eine verbesserte adoptive Immuntherapie mit RMS-spezifischen chimären T-Zellen *in vitro* und im Mausmodell zu entwickeln, Resistenzmechanismen gegen eine solche Therapie zu identifizieren und mögliche Strategien für ihre Überwindung zu entwickeln.

Die tumorspezifische zytotoxische Wirkung chimärer T-Zellen hängt von der Expression chimärer Antigenrezeptoren (CAR) ab, die im einfachsten Falle (Rezeptoren der ersten Generation) aus dem tumorantigen-spezifischen scFv-Fragment eines Antikörpers, einer IgG-Domäne und der CD3 ζ -Signaltransduktionsdomäne des T-Zellrezeptors bestehen. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass RMS als weitgehend tumorspezifisches Antigen den *fetalen* Acetylcholinrezeptor (fAChR) auf der Zelloberfläche exprimieren und von humanen fAChR-spezifischen chimären T-Zellen der ersten Generation erkannt werden. Die *In-vitro*-Zytotoxizität dieser chimären T-Zellen war aber für eine *In-vivo*-Anwendung zu gering.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde daher ein fAChR-spezifischer CAR der zweiten Generation kloniert, der zwischen der IgG- und CD3 ζ -Domäne eine zusätzliche kostimulatorische Domäne des CD28-Moleküls enthält. Diese Domäne dient der Kompensation insuffizienter kostimulatorischer Signale, die normalerweise durch kostimulatorische B7.1-, B7.2- und B7H2-Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen vermittelt werden und soll die Anergisierung chimärer T-Zellen verhindern. In Kokultivierungsexperimenten mit chimären T-Zellen und einem breiten Spektrum von RMS-Zellen konnte gezeigt werden, dass der CAR der zweiten Generation dem der ersten Generation in Bezug auf Zytotoxizität und T-Zellaktivierung signifikant überlegen war. Die Zelllyserate war aber insgesamt immer noch unbefriedigend und insbesondere stark von der verwendeten RMS-Zelllinie abhängig, sodass die Vermutung Zelllinien-spezifischer Resistenzmechanismen nahe lag.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden daher potenzielle Resistenzmechanismen untersucht, die auf einer ineffizienten Interaktion zwischen chimären T-Zellen und RMS beruhen könnten.

Erstens erwiesen sich - passend zu der verbesserten Aktivierung chimärer T-Zellen der zweiten Generation - RMS-Zelllinien und Tumorbiopsien auf Proteinebene als negativ bzw. nur schwach positiv für die CD28-Liganden B7.1 und B7.2 bzw. ICOS-L und ihre Expression war durch IFN γ und TNF α auch nicht (B7.1 und B7.2) oder nur schwach auf einzelnen RMS-Linien (ICOS-L) induzierbar.

Zweitens zeigte sich, dass auch die Expression „unspezifischer“ Adhäsionsmoleküle (CD54, CD56) für die effiziente Interaktion chimärer Effektorzellen mit RMS-Zellen *in vitro* und möglicherweise *in vivo* bei Patienten relevant sein könnte: So war *in vivo* eine Korrelation des CD54-Expressionsniveaus auf RMS mit dem Überleben der entsprechenden Patienten nachweisbar. Außerdem ließ sich bei primär CD54-negativen RMS-Zelllinien die Empfindlichkeit gegenüber chimären T-Zellen (die den CD54-Liganden LFA-1 tragen) durch CD54-Transfektion signifikant steigern, während dieser Effekt bei einer primär CD54-positiven RMS-Linie nicht erkennbar war. Darüber hinaus wirkten CD56-exprimierende chimäre Effektorzellen (NKT-Zellen und CIKs, „*cytokine-induced killer cells*“) zytotoxischer als CD56-negative chimäre T-Zellen, was möglicherweise mit der homotypischen CD56-CD56 Bindung zwischen NKT-Zellen (oder CIKs) und RMS-Zellen zusammenhängt, die CD56 genau wie RMS *in vivo* konsistent und stark exprimieren.

Drittens, wurde auf allen RMS-Zelllinien eine Oberflächen-Expression der immun-inhibitorischen Moleküle B7H1 und B7H3 nachgewiesen, wobei sich B7H3 bei den RMS-Biopsien als der stärker überexprimierte Inhibitor (verglichen mit normaler Muskulatur) erwies. Die besonders starke Expression von B7H1 auf der ARMS-Zelllinie RH30 ging mit einer verminderten Aktivierung chimärer T-Zellen einher. Blockierungs- und *knock down*-Experimente sind zur Klärung der funktionellen Relevanz von B7H1 und B7H3 geplant.

Viertens hängt die Zytotoxizität chimärer T-Zellen vom Expressionsniveau des spezifischen Targets, hier also des fAChR ab²⁵⁰. Deshalb wurde versucht, die fAChR-Expression durch IFN γ , TNF α oder deren Kombination zu steigern, was jedoch nicht gelang. Diese Untersuchungen ergaben als Nebenfunde, dass RMS gegenüber hohen IFN γ - und TNF α -Konzentrationen resistent sind (die Zytotoxizität chimärer T-Zellen von diesen Zytokinen also wahrscheinlich nicht abhängt), und offenbar eine epigenetisch bedingte Expressionshemmung zahlreicher IFN γ -Zielgene aufweisen.

Im dritte Teil der Arbeit wurden Apoptose-relevante Signalwege als potenzielle Resistenzmechanismen von RMS gegenüber chimären T-Zellen untersucht.

Die extrinsische Stimulation der Apoptose über Rezeptoren der TNF-Rezeptor Familie gelang lediglich mit TRAIL, nicht aber mit TNF α oder FAS-L. Allerdings war eine signifikante TRAIL-Sensitivität auf ARMS-Zelllinien beschränkt, während ERMS-Zellen resistent waren. Dieser Unterschied zwischen den RMS-Subtypen korrelierte gut mit dem schlechteren Ansprechen der ERMS-Zelllinien auf chimäre T-Zellen, wobei der Nachweis einer Kausalität und des zugrunde liegenden Mechanismus noch aussteht. Ebenso fehlt eine mechanistische Erklärung für die Resistenz aller RMS-Zelllinien gegenüber TNF α -induzierter Apoptose,

während die FAS-L Resistenz auf einen generellen FAS Rezeptorverlust bei RMS zurückzuführen war.

In Bezug auf die intrinsische/mitochondriale Apoptosekaskade konnte bei RMS-Zelllinien und Geweben eine massive Überexpression von Mitgliedern der „*inhibitor of apoptosis*“ (IAP)-Familie detektiert werden, die offensichtlich die Induktion der T-Zell-vermittelten Lysemechanismen bei RMS-Zellen erschwert. Die Ausschaltung dieser Resistenzmechanismen durch die Behandlung mit einem SMAC-Mimetic war ineffektiv und führte nur teilweise zu einer Degradierung der IAP-Proteinfamilie, wodurch die Effektivität der chimären T-Zellen nicht maßgeblich gesteigert wurde. Demgegenüber verbesserte die spezifische Inhibierung von Survivin mittels siRNA oder pharmakologischer Einflussnahme die Effektivität der chimären T-Zellen gegenüber den Tumorzellen signifikant.

Die vorgenannten Ergebnisse lieferten **im vierten Teil der Arbeit** die Rationale zur Etablierung eines *In-vivo*-Tiermodels, in dem die *In-vitro*-Befunde überprüft werden sollten. Die subkutane Injektion von RD6 ERMS-Zellen in immundefiziente NOD/SCID-Mäuse führte zu Tumorbildung und -wachstum, das durch einmalige Gabe chimärer T-Zellen verringert, aber nicht vollständig inhibiert wurde. Wegen schwerer toxischer Nebenwirkungen des Survivin-Inhibitors Celecoxib konnte nicht geklärt werden, ob chimäre T-Zellen und Survivin-Hemmung *in vivo* additiv oder synergistisch wirken.

Ausblick

Die Resultate dieser Arbeit geben erstmals einen Einblick in das komplexe und sehr uneinheitliche Netzwerk immunologischer und Apoptose-bezogener Resistenzmechanismen bei verschiedenen RMS *in vitro* und *in vivo*. Außerdem eröffnet die vorliegende Arbeit zahlreiche Perspektiven auf funktionelle und molekulare Untersuchungen, die zu einer Verbesserung der Therapie mit fAChR-spezifischen chimären T-Zellen führen könnten:

1. Unter translationalen Aspekten wird es Priorität haben, die Relevanz der Überexpression von IAPs (besonders von Survivin) in RMS für deren Therapieresistenz gegenüber chimären T-Zellen zu belegen. Dazu sind in xenogenen Mausmodellen vor der Gabe chimärer T-Zellen Survivin „*knock down*“-Experimente geplant, für die shRNA-Strategien und neue Survivin-Inhibitoren (z.B. YM155 oder Shepherdin^{398 400}) für *In-vivo*-Anwendungen zur Verfügung stehen.
2. Von großer Bedeutung wird auch die Analyse mehrfach *wiederholter* Gaben chimärer T-Zellen in Bezug auf das Tumorstadium sein, da Einmalgaben chimärer T Zellen nicht zur Tumoreradikation geführt haben.

3. Da die Expressionsintensitäten inhibitorischer Korezeptoren (z.B. B7H1), von Adhäsionsmolekülen (z.B. CD54) und des fAChR auf RMS-Zellen selbst großen Einfluss auf die zytotoxische Wirkung chimärer T Zellen haben, erscheint die Blockierung von B7H1 und B7H3 bzw. die pharmakologische Induktion von CD54 und fAChR auf RMS-Zellen als theoretisch vielversprechende, *in vitro* und *in vivo* überprüfbare Strategie. Auch die Rolle bisher nicht untersuchter Moleküle der Tumor/T Zell-Interaktion (z.B. CD40⁶⁵ oder Tim-3²⁵⁹) erscheint untersuchenswert.
4. Angesichts der starken und verbreiteten Expression des homotypisch bindenden CD56 auf RMS-Zellen *in vitro* und *in vivo*³¹⁷ und unseres vielversprechenden Pilotversuchs mit CD56-positiven NKT-Zellen sollte geprüft werden, ob bei der Therapie CD56-positiver RMS dem adoptiven Transfer CD56-positiver chimärer Effektorzellen der Vorzug vor CD56-negativen chimären T-Zellen zu geben ist.
5. Schließlich sollte über eine weitere Optimierung des chimären Rezeptors nachgedacht werden: mittlerweile stehen CARs der dritten Generation zur Verfügung, die aufgrund von verbesserten Proliferationsraten und einer längeren Verweildauer im Körper die Effektivität der T-Zell vermittelten Tumorzelllyse *in vivo* weiter steigern¹⁹². Zum anderen sollte die Affinität des verwendeten „single chain“-Fragments überprüft werden. Da gerade bei hochaffinen Antikörperfragmenten auch bei geringen Antikörperkonzentrationen eine effektivere Zelllyse beobachtet werden kann^{250 401}, sollte versucht werden, die Effektivität des fAChR-spezifischen chimären Rezeptors durch gerichtete Mutationen zu verbessern⁴⁰²⁻⁴⁰⁴.

Die hier beschriebenen Resistenzmechanismen und die möglichen Strategien zu ihrer Überwindung dürften über den adoptiven Transfer RMS-spezifischer T-Zellen hinausweisen und Relevanz für andere immunologische Therapiestrategien wie die Vakzinierung haben. Bemerkenswert war außerdem die beobachtete ausgeprägte Heterogenität der Resistenzmechanismen, die teilweise mit histologischen Subtypen segregierten, teilweise für individuelle RMS spezifisch waren und auf das Potential einer zukünftigen individualisierten Therapie von RMS-Patienten verweisen. Die Evaluierung kostimulatorischer bzw. inhibitorischer Rezeptoren (z.B. ICOS-L bzw. B7H1/ B7H3), von Adhäsionsmolekülen (z.B. CD54) und Apoptose-relevanten Proteinen als Biomarker erscheint nach den vorliegenden Befunden bei immunologischen Therapiestudien verschiedenster Art sinnvoll und sollte an unabhängigen, ausreichend großen und klinisch sowie (molekular-)pathologisch gut charakterisierten Patienten- bzw. Tumorkollektiven erfolgen.

5 LITERATUR

1. Dantonello TM, Int-Veen C, Harms D, Leuschner I, Schmidt BF, Herbst M, et al. Cooperative Trial CWS-91 for Localized Soft Tissue Sarcoma in Children, Adolescents, and Young Adults. *Journal of Clinical Oncology* 2009;27(9):1446-55.
2. Koscielniak E, Klingenbiel T. Weichteilsarkome. *AWMF online* 2011.
3. Ferrari A, Sultan I, Huang TT, Rodriguez-Galindo C, Shehadeh A, Meazza C, et al. Soft tissue sarcoma across the age spectrum: A population-based study from the surveillance epidemiology and end results database. *Pediatric Blood & Cancer* 2011;n/a-n/a.
4. Gallego Melcón S, Sánchez de Toledo Codina J. Molecular biology of rhabdomyosarcoma. *Clinical and Translation Oncology* 2007;9:415-19.
5. Jain S, Xu R, Prieto V, Lee P. Molecular classification of soft tissue sarcomas and its clinical applications. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2010;3(4):416-29.
6. Riggi N, Cironi L, Suvà ML, Stamenkovic I. Sarcomas: genetics, signalling, and cellular origins. Part 1: The fellowship of TET. *The Journal of Pathology* 2007;213(1):4-20.
7. Tiffin N, Williams RD, Shipley J, Pritchard-Jones K. PAX7 expression in embryonal rhabdomyosarcoma suggests an origin in muscle satellite cells. *Br J Cancer*;89(2):327-32.
8. Hayes-Jordan A, Andrassy R. Rhabdomyosarcoma in children. *Current Opinion in Pediatrics* 2009;21(3):373-78.
9. Gallego Melcón S, Sánchez de Toledo Codina J. Molecular biology of rhabdomyosarcoma. *Clinical and Translational Oncology* 2007;9(7):415-19.
10. Sultan I, Qaddoumi I, Yaser S, Rodriguez-Galindo C, Ferrari A. Comparing Adult and Pediatric Rhabdomyosarcoma in the Surveillance, Epidemiology and End Results Program, 1973 to 2005: An Analysis of 2,600 Patients. *Journal of Clinical Oncology* 2009;27(20):3391-97.
11. Saab R, Spunt SL, Skapek SX, Michael AD. Myogenesis and Rhabdomyosarcoma: The Jekyll and Hyde of Skeletal Muscle. *Current Topics in Developmental Biology*: Academic Press, 2011:197-234.
12. Parham DM, Ellison DA. Rhabdomyosarcomas in Adults and Children: An Update. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2006;130(10):1454-65.
13. Wachtel M, Runge T, Leuschner I, Stegmaier S, Koscielniak E, Treuner Jr, et al. Subtype and Prognostic Classification of Rhabdomyosarcoma by Immunohistochemistry. *Journal of Clinical Oncology* 2006;24(5):816-22.
14. Davicioni E, Anderson MJ, Finckenstein FG, Lynch JC, Qualman SJ, Shimada H, et al. Molecular Classification of Rhabdomyosarcoma-Genotypic and Phenotypic Determinants of Diagnosis: A Report from the Children's Oncology Group. *Am J Pathol* 2009;174(2):550-64.
15. Parham DM. Pathologic Classification of Rhabdomyosarcomas and Correlations with Molecular Studies. *Mod Pathol* 2001;14(5):506-14.
16. Anderson J, Gordon A, McManus A, Shipley J, Pritchard-Jones K. Disruption of Imprinted Genes at Chromosome Region 11p15.5 in Paediatric Rhabdomyosarcoma. *Neoplasia* 1999;1(4):340-48.
17. Steenman MJC, Rainier S, Dobry CJ, Grundy P, Horon IL, Feinberg AP. Loss of imprinting of IGF2 is linked to reduced expression and abnormal methylation of H19 in Wilms' tumour. *Nat Genet* 1994;7(3):433-39.
18. Lobo I. Genomic Imprinting and Patterns of Disease Inheritance. *Nature Education* 2008;1(1).

19. Makawita S, Ho M, Durbin AD, Thorner PS, Malkin D, Somers GR. Expression of Insulin-Like Growth Factor Pathway Proteins in Rhabdomyosarcoma: IGF-2 Expression Is Associated with Translocation-Negative Tumors. *Pediatric and Developmental Pathology* 2008;12(2):127-35.
20. Fitzgerald JC, Scherr AM, Barr FG. Structural Analysis of PAX7 Rearrangements in Alveolar Rhabdomyosarcoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2000;117(1):37-40.
21. Keller C, Hansen MS, Coffin CM, Capecchi MR. Pax3:Fkhr interferes with embryonic Pax3 and Pax7 function: implications for alveolar rhabdomyosarcoma cell of origin. *Genes & Development* 2004;18(21):2608-13.
22. Anderson J, Ramsay A, Gould S, Pritchard-Jones K. PAX3-FKHR Induces Morphological Change and Enhances Cellular Proliferation and Invasion in Rhabdomyosarcoma. *The American journal of pathology* 2001;159(3):1089-96.
23. Kempf BE, Vogt PK. A Genetic Analysis of PAX3-FKHR, the Oncogene of Alveolar Rhabdomyosarcoma. *Cell Growth Differ* 1999;10(12):813-18.
24. Sumegi J, Streblow R, Frayer RW, Cin PD, Rosenberg A, Meloni-Ehrig A, et al. Recurrent t(2;2) and t(2;8) translocations in rhabdomyosarcoma without the canonical PAX-FOXO1 fuse PAX3 to members of the nuclear receptor transcriptional coactivator family. *Genes, Chromosomes and Cancer* 2010;49(3):224-36.
25. Sorensen PHB, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM, et al. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR Gene Fusions Are Prognostic Indicators in Alveolar Rhabdomyosarcoma: A Report From the Children's Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology* 2002;20(11):2672-79.
26. Sebire NJ, Malone M. Myogenin and MyoD1 expression in paediatric rhabdomyosarcomas. *Journal of Clinical Pathology* 2003;56(6):412-16.
27. Scrable H, Witte D, Shimada H, Seemayer T, Wang-Wuu S, Soukup S. Molecular differential pathology in rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1989;1:23-35.
28. Mok GF, Sweetman D. Many routes to the same destination: lessons from skeletal muscle development. *Reproduction* 2011;141(3):301-12.
29. Dedieu S, Mazères G, Dourdin N, Cottin P, Brustis J-J. Transactivation of capn2 by Myogenic Regulatory Factors During Myogenesis. *Journal of Molecular Biology* 2003;326(2):453-65.
30. Otto A, Schmidt C, Patel K. Pax3 and Pax7 expression and regulation in the avian embryo. *Anatomy and Embryology* 2006;211(4):293-310.
31. Oustanina S, Hause G, Braun T. Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *EMBO J* 2004;23(16):3430-39.
32. Tremblay P, Dietrich S, Mericskay M, Schubert FR, Li Z, Paulin D. A Crucial Role for Pax3 in the Development of the Hypaxial Musculature and the Long-Range Migration of Muscle Precursors. *Developmental Biology* 1998;203(1):49-61.
33. Collins CA, Gnocchi VF, White RB, Boldrin L, Perez-Ruiz A, Relaix F, et al. Integrated functions of Pax3 and Pax7 in the regulation of proliferation, cell size and myogenic differentiation. *PloS one* 2009;4(2):e4475.
34. Bajard L, Relaix F, Lagha M, Rocancourt D, Daubas P, Buckingham ME. A novel genetic hierarchy functions during hypaxial myogenesis: Pax3 directly activates Myf5 in muscle progenitor cells in the limb. *Genes & Development* 2006;20(17):2450-64.
35. Sato T, Rocancourt D, Marques L, Thorsteinsdóttir S, Buckingham M. A Pax3/Dmrt2/Myf5 Regulatory Cascade Functions at the Onset of Myogenesis. *PLoS Genet* 2010;6(4):e1000897.
36. Maroto M, Reshef R, Münsterberg AE, Koester S, Goulding M, Lassar AB. Ectopic Pax-3 Activates MyoD and Myf-5 Expression in Embryonic Mesoderm and Neural Tissue. *Cell* 1997;89(1):139-48.

37. Miller PJ, Hollenbach AD. The oncogenic fusion protein Pax3–FKHR has a greater post-translational stability relative to Pax3 during early myogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2007;1770(10):1450-58.
38. Zammit PS, Relaix F, Nagata Y, Pérez Ruiz A, Collins CA, Partridge TA, et al. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *Journal of Cell Science* 2006.
39. Collins CA, Gnocchi VF, White RB, Boldrin L, Perez-Ruiz A, Relaix F, et al. Integrated Functions of Pax3 and Pax7 in the Regulation of Proliferation, Cell Size and Myogenic Differentiation. *PLoS ONE* 2009;4(2):4475.
40. Blake J, Ziman M. Aberrant PAX3 and PAX7 expression. A link to the metastatic potential of embryonal rhabdomyosarcoma and cutaneous malignant melanoma? *Histol Histopathol* 2003;18:529-39.
41. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
42. Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini P-L. 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2011;60(3):319-26.
43. Poschke I, Mougiakakos D, Kiessling R. Camouflage and sabotage: tumor escape from the immune system. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2011;60(8):1161-71.
44. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *International Journal of Cancer* 2010;127(4):759-67.
45. Mantovani A. Cancer: Inflaming metastasis. *Nature* 2009;457(7225):36-37.
46. Yang L, Huang J, Ren X, Gorska AE, Chytil A, Aakre M, et al. Abrogation of TGF β Signaling in Mammary Carcinomas Recruits Gr-1+CD11b+ Myeloid Cells that Promote Metastasis. *Cancer cell* 2008;13(1):23-35.
47. Wyckoff JB, Wang Y, Lin EY, Li J-f, Goswami S, Stanley ER, et al. Direct Visualization of Macrophage-Assisted Tumor Cell Intravasation in Mammary Tumors. *Cancer Research* 2007;67(6):2649-56.
48. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420(6917):860-67.
49. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annual Review of Immunology* 2004;22(1):329-60.
50. Reiman JM, Kmiecik M, Manjili MH, Knutson KL. Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Seminars in Cancer Biology* 2007;17(4):275-87.
51. Kortylewski M, Komyod W, Kauffmann M-E, Bosserhoff A, Heinrich PC, Behrmann I. Interferon-[gamma]-Mediated Growth Regulation of Melanoma Cells: Involvement of STAT1-Dependent and STAT1-Independent Signals. *J Invest Dermatol* 2004;122(2):414-22.
52. Saha B, Jyothi Prasanna S, Chandrasekar B, Nandi D. Gene modulation and immunoregulatory roles of Interferon[gamma]. *Cytokine*;50(1):1-14.
53. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 2011;331(6024):1565-70.
54. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annual Review of Immunology* 2011;29(1):235-71.
55. Rufer E, Leonhardt RM, Knittler MR. Molecular Architecture of the TAP-Associated MHC Class I Peptide-Loading Complex. *The Journal of Immunology* 2007;179(9):5717-27.
56. Dimberu PM, Leonhardt RM. Cancer Immunotherapy Takes a Multi-Faceted Approach to Kick the Immune System into Gear. *Yale J Biol Med* 2011;84(4):371-80.
57. Friedman E. Immune Modulation by Ionizing Radiation and its Implications for Cancer Immunotherapy. *Current Pharmaceutical Design* 2002;8(19).
58. Li Z, Pradera F, Kammertoens T, Li B, Liu S, Qin Z. Cross-Talk between T Cells and Innate Immune Cells Is Crucial for IFN- γ -Dependent Tumor Rejection. *The Journal of Immunology* 2007;179(3):1568-76.

59. Wigginton JM, Gruys E, Geiselhart L, Subleski J, Komschlies KL, Park J-W, et al. IFN- γ and Fas/FasL are required for the antitumor and antiangiogenic effects of IL-12/pulse IL-2 therapy. *The Journal of Clinical Investigation* 2001;108(1):51-62.
60. Chavez-Galan L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chavez R, Lascurain R. Cell Death Mechanisms Induced by Cytotoxic Lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 2009;6(1):15-25.
61. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002;2(10):735-47.
62. Dunn G, Ikeda H, Bruce A, Koebel C, Uppaluri R, Bui J, et al. Interferon-gamma and cancer immunoediting. *Immunologic research* 2005;32(1-3):231-45.
63. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of [ldquo]tumor escape[rdquo] phenotypes. *Nat Immunol* 2002;3(11):999-1005.
64. Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *Journal of Cellular Physiology* 2003;195(3):346-55.
65. Usui Y, Okunuki Y, Hattori T, Takeuchi M, Kezuka T, Goto H, et al. Expression of Costimulatory Molecules on Human Retinoblastoma Cells Y-79: Functional Expression of CD40 and B7H1. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2006;47(10):4607-13.
66. Waschbisch A, Wintterle S, Lochmüller H, Walter MC, Wischhusen J, Kieseier BC, et al. Human muscle cells express the costimulatory molecule B7-H3, which modulates muscle-immune interactions. *Arthritis & Rheumatism* 2008;58(11):3600-08.
67. Colombo MP, Piconese S. Regulatory T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007;7(11):880-87.
68. Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, Johansson CC. Chapter 3 - Regulatory T Cells in Cancer. In: George FVW, George K, editors. *Advances in Cancer Research*: Academic Press, 2010:57-117.
69. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009;9(3):162-74.
70. Diaz-Montero C, Salem M, Nishimura M, Garrett-Mayer E, Cole D, Montero A. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2009;58(1):49-59.
71. Aguilar LK, Guzik BW, Aguilar-Cordova E. Cytotoxic immunotherapy strategies for cancer: Mechanisms and clinical development. *Journal of Cellular Biochemistry* 2011;112(8):1969-77.
72. Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. Clonal Expansion Versus Functional Clonal Inactivation: A Costimulatory Signalling Pathway Determines the Outcome of T Cell Antigen Receptor Occupancy. *Annual Review of Immunology* 1989;7(1):445-80.
73. Foell J, Hewes B, Mittler R. T cell costimulatory and inhibitory receptors as therapeutic targets for inducing anti-tumor immunity. *Current Cancer Drug Targets* 2007;7(1).
74. Nouri-Shirazi M, Banchereau J, Bell D, Burkeholder S, Kraus ET, Davoust J, et al. Dendritic Cells Capture Killed Tumor Cells and Present Their Antigens to Elicit Tumor-Specific Immune Responses. *The Journal of Immunology* 2000;165(7):3797-803.
75. Nowak AK, Lake RA, Marzo AL, Scott B, Heath WR, Collins EJ, et al. Induction of Tumor Cell Apoptosis In Vivo Increases Tumor Antigen Cross-Presentation, Cross-Priming Rather than Cross-Tolerizing Host Tumor-Specific CD8 T Cells. *The Journal of Immunology* 2003;170(10):4905-13.
76. Hishii, Kurnick, Ramirez M, Pandolfi. Studies of the mechanism of cytolysis by tumour-infiltrating lymphocytes. *Clinical & Experimental Immunology* 1999;116(3):388-94.
77. MacFarlane M. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicology Letters* 2003;139(2-3):89-97.

-
78. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies Within. *Science* 1998;281(5381):1312-16.
 79. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407(6805):770-76.
 80. Hail N, Carter B, Konopleva M, Andreeff M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. *Apoptosis* 2006;11(6):889-904.
 81. Bouchier-Hayes L, Lartigue L, Newmeyer DD. Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. *The Journal of Clinical Investigation* 2005;115(10):2640-47.
 82. Jiang X, Wang X. Cytochrome c Promotes Caspase-9 Activation by Inducing Nucleotide Binding to Apaf-1. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275(40):31199-203.
 83. Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J* 2004;23(10):2134-45.
 84. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 Family Reunion. *Molecular cell* 2010;37(3):299-310.
 85. Dewson G, Kluck RM. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *Journal of Cell Science* 2009;122(16):2801-08.
 86. Willis SN, Adams JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* 2005;17(6):617-25.
 87. Fuchs Y, Steller H. Programmed Cell Death in Animal Development and Disease. *Cell* 2011;147(4):742-58.
 88. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System. *Immunity* 2009;30(2):180-92.
 89. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell* 2001;104(4):487-501.
 90. Chan FK-M, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. A Domain in TNF Receptors That Mediates Ligand-Independent Receptor Assembly and Signaling. *Science* 2000;288(5475):2351-54.
 91. Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *The FASEB Journal* 2009;23(6):1625-37.
 92. Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedrick SM, Hueber A-O, Newell MK, et al. The CD95 Receptor: Apoptosis Revisited. *Cell* 2007;129(3):447-50.
 93. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000;407(6805):789-95.
 94. Siegel RM, Muppidi JR, Sarker M, Lobito A, Jen M, Martin D, et al. SPOTS. *The Journal of Cell Biology* 2004;167(4):735-44.
 95. Meng XW, Peterson KL, Dai H, Schneider P, Lee S-H, Zhang J-S, et al. High Cell Surface Death Receptor Expression Determines Type I Versus Type II Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286(41):35823-33.
 96. Lee K-H, Feig C, Tchikov V, Schickel R, Hallas C, Schutze S, et al. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *EMBO J* 2006;25(5):1009-23.
 97. Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, et al. A Unified Model for Apical Caspase Activation. *Molecular cell* 2003;11(2):529-41.
 98. Kang T-B, Oh G-S, Scandella E, Bolinger B, Ludewig B, Kovalenko A, et al. Mutation of a Self-Processing Site in Caspase-8 Compromises Its Apoptotic but Not Its Nonapoptotic Functions in Bacterial Artificial Chromosome-Transgenic Mice. *The Journal of Immunology* 2008;181(4):2522-32.
 99. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998;17(6):1675-87.
 100. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 2009;30:180-92.

101. Barnhart BC, Legembre P, Pietras E, Bubici C, Franzoso G, Peter ME. CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *EMBO J* 2004;23(15):3175-85.
102. Peter ME, Legembre P, Barnhart BC. Does CD95 have tumor promoting activities? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2005;1755(1):25-36.
103. Legembre P, Barnhart BC, Peter ME. The relevance of NF- κ B for CD95 Signaling in Tumor Cells. *Cell Cycle* 2004;3(10):1235-39.
104. Legembre P, Barnhart BC, Zheng L, Vijayan S, Straus SE, Puck J, et al. Induction of apoptosis and activation of NF-[kappa]B by CD95 require different signalling thresholds. *EMBO Rep* 2004;5(11):1084-89.
105. Clancy L, Mruk K, Archer K, Woelfel M, Mongkolsapaya J, Screaton G, et al. Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102(50):18099-104.
106. Riccioni R, Pasquini L, Mariani G, Saulle E, Rossini A, Diverio D, et al. TRAIL decoy receptors mediate resistance of acute myeloid leukemia cells to TRAIL. *Haematologica* 2005;90(5):612-24.
107. Kuang AA, Diehl GE, Zhang J, Winoto A. FADD Is Required for DR4- and DR5-mediated Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275(33):25065-68.
108. Kohlhaas SL, Craxton A, Sun X-M, Pinkoski MJ, Cohen GM. Receptor-mediated Endocytosis Is Not Required for Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282(17):12831-41.
109. Lin Y, Devin A, Cook A, Keane MM, Kelliher M, Lipkowitz S, et al. The Death Domain Kinase RIP Is Essential for TRAIL (Apo2L)-Induced Activation of I κ B Kinase and c-Jun N-Terminal Kinase. *Molecular and Cellular Biology* 2000;20(18):6638-45.
110. Varfolomeev E, Maecker H, Sharp D, Lawrence D, Renz M, Vucic D, et al. Molecular Determinants of Kinase Pathway Activation by Apo2 Ligand/Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280(49):40599-608.
111. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science* 2002;296(5573):1634-35.
112. David J M. TNF receptor subtype signalling: Differences and cellular consequences. *Cellular Signalling* 2002;14(6):477-92.
113. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003;10(1):45-65.
114. Li H, Kobayashi M, Blonska M, You Y, Lin X. Ubiquitination of RIP Is Required for Tumor Necrosis Factor α -induced NF- κ B Activation. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281(19):13636-43.
115. Mahoney DJ, Cheung HH, Mrad RL, Plenchette S, Simard C, Enwere E, et al. Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF α -mediated NF- κ B activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105(33):11778-83.
116. Fan Y, Yu Y, Shi Y, Sun W, Xie M, Ge N, et al. Lysine 63-linked Polyubiquitination of TAK1 at Lysine 158 Is Required for Tumor Necrosis Factor α - and Interleukin-1 β -induced IKK/NF- κ B and JNK/AP-1 Activation. *Journal of Biological Chemistry* 2010;285(8):5347-60.
117. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. *Cell* 2003;114(2):181-90.
118. Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J, Jakob M, Winoto-Morbach S, Held-Feindt J, et al. Compartmentalization of TNF Receptor 1 Signaling: Internalized TNF Receptosomes as Death Signaling Vesicles. *Immunity* 2004;21(3):415-28.

119. Cullen SP, Martin SJ. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ* 2007;15(2):251-62.
120. Cullen SP, Brunet M, Martin SJ. Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death Differ* 2009;17(4):616-23.
121. Adrain C, Murphy BM, Martin SJ. Molecular Ordering of the Caspase Activation Cascade Initiated by the Cytotoxic T Lymphocyte/Natural Killer (CTL/NK) Protease Granzyme B. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280(6):4663-73.
122. Barry M, Heibein JA, Pinkoski MJ, Lee S-F, Moyer RW, Green DR, et al. Granzyme B Short-Circuits the Need for Caspase 8 Activity during Granule-Mediated Cytotoxic T-Lymphocyte Killing by Directly Cleaving Bid. *Molecular and Cellular Biology* 2000;20(11):3781-94.
123. Alimonti JB, Shi L, Baijal PK, Greenberg AH. Granzyme B Induces BID-mediated Cytochrome c Release and Mitochondrial Permeability Transition. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276(10):6974-82.
124. Pinkoski MJ, Waterhouse NJ, Heibein JA, Wolf BB, Kuwana T, Goldstein JC, et al. Granzyme B-mediated Apoptosis Proceeds Predominantly through a Bcl-2-inhibitable Mitochondrial Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276(15):12060-67.
125. Sutton VR, Davis JE, Cancilla M, Johnstone RW, Ruefli AA, Sedelies K, et al. Initiation of Apoptosis by Granzyme B Requires Direct Cleavage of Bid, but Not Direct Granzyme B-Mediated Caspase Activation. *The Journal of Experimental Medicine* 2000;192(10):1403-14.
126. Vucic D, Dixit VM, Wertz IE. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12(7):439-52.
127. Altieri D. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochemical Journal* 2010;430(2):199-205.
128. Srinivasula SM, Ashwell JD. IAPs: What's in a Name? *Molecular cell* 2008;30(2):123-35.
129. Liu Z, Sun C, Olejniczak ET, Meadows RP, Betz SF, Oost T, et al. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* 2000;408(6815):1004-08.
130. Wu G, Chai J, Suber TL, Wu J-W, Du C, Wang X, et al. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 2000;408(6815):1008-12.
131. Huang Y, Park YC, Rich RL, Segal D, Myszkowski DG, Wu H. Structural Basis of Caspase Inhibition by XIAP: Differential Roles of the Linker versus the BIR Domain. *Cell* 2001;104(5):781-90.
132. Scott FL, Denault J-B, Riedl SJ, Shin H, Renatus M, Salvesen GS. XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *EMBO J* 2005;24(3):645-55.
133. Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001;98(15):8662-67.
134. Schile AJ, Garcia-Fernandez M, Steller H. Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity. *Genes Dev.* 2008;22:2256-66.
135. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(6):401-10.
136. Ea C-K, Deng L, Xia Z-P, Pineda G, Chen ZJ. Activation of IKK by TNF α Requires Site-Specific Ubiquitination of RIP1 and Polyubiquitin Binding by NEMO. *Molecular cell* 2006;22(2):245-57.
137. Dohi T, Okada K, Xia F, Wilford CE, Samuel T, Welsh K, et al. An IAP-IAP Complex Inhibits Apoptosis. *Journal of biological chemistry* 2004;279(33):34087-90.

138. Dohi T, Xia F, Altieri DC. Compartmentalized Phosphorylation of IAP by Protein Kinase A Regulates Cytoprotection. *Molecular cell* 2007;27(1):17-28.
139. Lu M, Lin S-C, Huang Y, Kang YJ, Rich R, Lo Y-C, et al. XIAP Induces NF- κ B Activation via the BIR1/TAB1 Interaction and BIR1 Dimerization. *Molecular cell* 2007;26(5):689-702.
140. Guha M, Xia F, Raskett CM, Altieri DC. Caspase 2-mediated tumor suppression involves survivin gene silencing. *Oncogene* 2010;29(9):1280-92.
141. Jin H-S, Lee D-H, Kim D-H, Chung J-H, Lee S-J, Lee TH. cIAP1, cIAP2, and XIAP Act Cooperatively via Nonredundant Pathways to Regulate Genotoxic Stress-Induced Nuclear Factor- κ B Activation. *Cancer Research* 2009;69(5):1782-91.
142. Baud V, Karin M. Is NF- κ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8(1):33-40.
143. Ceballos-Cancino G, Espinosa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin. *Oncogene* 2007;26(54):7569-75.
144. Green DR, Kroemer G. The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. *Science* 2004;305(5684):626-29.
145. Fortugno P, Beltrami E, Plescia J, Fontana J, Pradhan D, Marchisio PC, et al. Regulation of survivin function by Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003;100(24):13791-96.
146. Ghosh JC, Dohi T, Kang BH, Altieri DC. Hsp60 Regulation of Tumor Cell Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2008;283(8):5188-94.
147. Pandolfi F, Cianci R, Lolli S, Dunn I, Newton E, Haggerty T, et al. Strategies to overcome obstacles to successful immunotherapy of melanoma. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2008;21(3):493-500.
148. Romero JM, Jiménez P, Cabrera T, Cózar JM, Pedrinaci S, Tallada M, et al. Coordinated downregulation of the antigen presentation machinery and HLA class I/ β 2-microglobulin complex is responsible for HLA-ABC loss in bladder cancer. *International Journal of Cancer* 2005;113(4):605-10.
149. Kooi S, Zhang H-Z, Patenia R, Edwards CL, Platsoucas CD, Freedman RS. HLA Class I Expression on Human Ovarian Carcinoma Cells Correlates with T-Cell Infiltration in Vivo and T-Cell Expansion in Vitro in Low Concentrations of Recombinant Interleukin-2. *Cellular Immunology* 1996;174(2):116-28.
150. Rodriguez T, Mendez R, Del Campo A, Jimenez P, Aptsiauri N, Garrido F, et al. Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines. *BMC Cancer* 2007;7(1):34.
151. Garrido F, Algarra I, García-Lora A. The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible "hard" lesions. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2010;59(10):1601-06.
152. Lin A, Yan W-H, Xu H-H, Gan M-F, Cai J-F, Zhu M, et al. HLA-G expression in human ovarian carcinoma counteracts NK cell function. *Annals of Oncology* 2007;18(11):1804-09.
153. Wischhusen J, Friese MA, Mittelbronn M, Meyermann R, Weller M. HLA-E Protects Glioma Cells from NKG2D-Mediated Immune Responses In Vitro: Implications for Immune Escape In Vivo. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2005;64(6):523-28.
154. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007;104(9):3360-65.

155. Okazaki T, Honjo T. The PD-1–PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends in Immunology* 2006;27(4):195-201.
156. Hirano F, Kaneko K, Tamura H, Dong H, Wang S, Ichikawa M, et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by Monoclonal Antibodies Potentiates Cancer Therapeutic Immunity. *Cancer Research* 2005;65(3):1089-96.
157. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine* 2010;363(8):711-23.
158. Iwai Y, Terawaki S, Honjo T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *International Immunology* 2005;17(2):133-44.
159. Crescioli C, Sottili M, Bonini P, Cosmi L, Chiarugi P, Romagnani P, et al. Inflammatory response in human skeletal muscle cells: CXCL10 as a potential therapeutic target. *European Journal of Cell Biology* 2012;91(2):139-49.
160. Wiendl H, Hohlfeld R, Kieseier BC. Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological microenvironment. *Trends in Immunology* 2005;26(7):373-80.
161. Curnow J, Corlett L, Willcox N, Vincent A. Presentation by myoblasts of an epitope from endogenous acetylcholine receptor indicates a potential role in the spreading of the immune response. *Journal of Neuroimmunology* 2001;115(1–2):127-34.
162. Marino M, Scuderi F, Mazzarelli P, Mannella F, Provenzano C, Bartoccioni E. Constitutive and cytokine-induced expression of MHC and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human myoblasts. *Journal of Neuroimmunology* 2001;116(1):94-101.
163. Nagaraju K. Immunological capabilities of skeletal muscle cells. *Acta Physiologica Scandinavica* 2001;171(3):215-23.
164. Wiendl H, Hohlfeld R, Kieseier B. Muscle-derived positive and negative regulators of the immune response. *Current Opinion in Rheumatology* 2005;17(6):714-19.
165. Curnow SJ, Willcox N, Vincent A. Induction of primary immune responses by allogeneic human myoblasts: dissection of the cell types required for proliferation, IFN γ secretion and cytotoxicity. *Journal of Neuroimmunology* 1998;86(1):53-62.
166. Wiendl H, Mitsdoerffer M, Schneider D, Melms A, Lochmuller H, Hohlfeld R, et al. Muscle fibres and cultured muscle cells express the B7.1/2 related inducible co-stimulatory molecule, ICOSL: implications for the pathogenesis of inflammatory myopathies *Brain* 2003;126(5):1026-35.
167. Bernasconi P, Confalonieri P, Andreetta F, Baggi F, Cornelio F, Mantegazza R. The expression of co-stimulatory and accessory molecules on cultured human muscle cells is not dependent on stimulus by pro-inflammatory cytokines: relevance for the pathogenesis of inflammatory myopathy. *Journal of neuroimmunology* 1998;85(1):52-58.
168. Behrens L, Kerschensteiner M, Misgeld T, Goebels N, Wekerle H, Hohlfeld R. Human Muscle Cells Express a Functional Costimulatory Molecule Distinct from B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) In Vitro and in Inflammatory Lesions. *J Immunol* 1998; 161:5943-51.
169. Schmidt J, Rakocevic G, Raju R, Dalakas MC. Upregulated inducible co-stimulator (ICOS) and ICOS-ligand in inclusion body myositis muscle: significance for CD8+ T cell cytotoxicity *Brain* 2004;127(5):1182-90.
170. Carosella ED, Moreau P, Aractingi S, Rouas-Freiss N. HLA-G: a shield against inflammatory aggression. *Trends in Immunology* 2001;22(10):553-55.
171. Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V, Wischhusen J, Weiss EH, Dichgans J, et al. The non-classical MHC molecule HLA-G protects human muscle cells from immune-

- mediated lysis: implications for myoblast transplantation and gene therapy. *Brain* 2003;126(1):176-85.
172. Urruticoechea A, Alemany R, Balart J, Villanueva A, Vinals F, Capella G. Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. *Current Pharmaceutical Design* 2010;16(1):3-10.
173. Rosenberg SA. Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer[mdash]what clinicians need to know. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8(10):577-85.
174. Fang L, Lonsdorf AS, Hwang ST. Immunotherapy for Advanced Melanoma. *J Invest Dermatol* 0000;128(11):2596-605.
175. Chang M-H, You S-L, Chen C-J, Liu C-J, Lee C-M, Lin S-M, et al. Decreased Incidence of Hepatocellular Carcinoma in Hepatitis B Vaccinees: A 20-Year Follow-up Study. *Journal of the National Cancer Institute* 2009;101(19):1348-55.
176. Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *The Journal of Clinical Investigation* 2006;116(5):1167-73.
177. Chen Y-Z, Yao X-L, Tabata Y, Nakagawa S, Gao J-Q. Gene Carriers and Transfection Systems Used in the Recombination of Dendritic Cells for Effective Cancer Immunotherapy. *Clinical and Developmental Immunology* 2010;2010.
178. Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA, Zarour H, Kalinski P, Ferrone S. Immunotherapy of cancer in 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2012;n/a-n/a.
179. Di Nicola M, Zappasodi R, Carlo-Stella C, Mortarini R, Pupa SM, Magni M, et al. Vaccination with autologous tumor-loaded dendritic cells induces clinical and immunologic responses in indolent B-cell lymphoma patients with relapsed and measurable disease: a pilot study. *Blood* 2009;113(1):18-27.
180. Beer TM, Bernstein GT, Corman JM, Glode LM, Hall SJ, Poll WL, et al. Randomized Trial of Autologous Cellular Immunotherapy with Sipuleucel-T in Androgen-Dependent Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research* 2011;17(13):4558-67.
181. Higano CS, Schellhammer PF, Small EJ, Burch PA, Nemunaitis J, Yuh L, et al. Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer* 2009;115(16):3670-79.
182. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer Regression and Autoimmunity in Patients After Clonal Repopulation with Antitumor Lymphocytes. *Science* 2002;298(5594):850-54.
183. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2008;8(4):299-308.
184. Wrzesinski C, Paulos CM, Kaiser A, Muranski P, Palmer DC, Gattinoni L, et al. Increased Intensity Lymphodepletion Enhances Tumor Treatment Efficacy of Adoptively Transferred Tumor-specific T Cells. *Journal of Immunotherapy* 2010;33(1).
185. Cartellieri M, Bachmann M, Feldmann A, Bippes C, Stamova S, Wehner R, et al. Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells for Immunotherapy of Cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010;2010.
186. Bendle GM, Haanen JBAG, Schumacher TNM. Preclinical development of T cell receptor gene therapy. *Current Opinion in Immunology* 2009;21(2):209-14.
187. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 2011;480(7378):480-89.
188. Moritz D, Groner B. A spacer region between the single chain antibody and the CDS ζ chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signaling activity. *Gene Ther* 1995;2(8):539-46.
189. Haynes NM, Snook MB, Trapani JA, Cerruti L, Jane SM, Smyth MJ, et al. Redirecting Mouse CTL Against Colon Carcinoma: Superior Signaling Efficacy of Single-Chain

- Variable Domain Chimeras Containing TCR- ζ vs Fc ϵ RI- γ . *The Journal of Immunology* 2001;166(1):182-87.
190. Hombach A, Wiczarkowicz A, Marquardt T, Heuser C, Usai L, Pohl C, et al. Tumor-Specific T Cell Activation by Recombinant Immunoreceptors: CD3{zeta} Signaling and CD28 Costimulation Are Simultaneously Required for Efficient IL-2 Secretion and Can Be Integrated Into One Combined CD28/CD3{zeta} Signaling Receptor Molecule. *J Immunol* 2001;167(11):6123-31.
191. Kowolik CM, Topp MS, Gonzalez S, Pfeiffer T, Olivares S, Gonzalez N, et al. CD28 Costimulation Provided through a CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor Enhances In vivo Persistence and Antitumor Efficacy of Adoptively Transferred T Cells. *Cancer Research* 2006;66(22):10995-1004.
192. Hombach A, Abken H. Costimulation tunes tumor-specific activation of redirected T cells in adoptive immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2007;56(5):731-37.
193. Schmidt P, Abken H. *The beating heart of melanomas: a minor subset of cancer cells sustains tumor growth*, 2011.
194. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, et al. Tumor Regression in Patients With Metastatic Synovial Cell Sarcoma and Melanoma Using Genetically Engineered Lymphocytes Reactive With NY-ESO-1. *Journal of Clinical Oncology* 2011;29(7):917-24.
195. Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, et al. T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia. *Science Translational Medicine* 2011;3(95):95ra73.
196. Carli M, Colombatti R, Oberlin O, Bisogno G, Treuner J, Koscielniak E, et al. European Intergroup Studies (MMT4-89 and MMT4-91) on Childhood Metastatic Rhabdomyosarcoma: Final Results and Analysis of Prognostic Factors. *Journal of Clinical Oncology* 2004;22(23):4787-94.
197. Koscielniak E, Morgan M, Treuner J. Soft Tissue Sarcoma in Children: Prognosis and Management. *Pediatric Drugs* 2002;4(1):21-28.
198. Oberlin O, Rey A, Lyden E, Bisogno G, Stevens MCG, Meyer WH, et al. Prognostic Factors in Metastatic Rhabdomyosarcomas: Results of a Pooled Analysis From United States and European Cooperative Groups. *Journal of Clinical Oncology* 2008;26(14):2384-89.
199. Hudson MM, Mertens AC, Yasui Y, Hobbie W, Chen H, Gurney JG, et al. Health Status of Adult Long-term Survivors of Childhood Cancer. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 2003;290(12):1583-92.
200. Stevens MCG. Treatment for childhood rhabdomyosarcoma: the cost of cure. *The Lancet Oncology* 2005;6(2):77-84.
201. Walterhouse D, Watson A. Optimal Management Strategies for Rhabdomyosarcoma in Children. *Pediatric Drugs* 2007;9(6):391-400.
202. Dantonello T, Int-Veen C, Harms D, Leuschner I, Schmidt B, Herbst M, et al. Cooperative Trial CWS-91 for Localized Soft Tissue Sarcoma in Children, Adolescents, and Young Adults. *J Clin Oncol* 2009;27(9):1446-55.
203. Crist WM, Anderson JR, Meza JL, Fryer C, Raney RB, Ruymann FB, et al. Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-IV: Results for Patients With Nonmetastatic Disease. *Journal of Clinical Oncology* 2001;19(12):3091-102.
204. Fowlkes BJ. A novel population of T-cell receptor [alpha][beta]-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V[beta]-gene family. *Nature* 1987;329:251-54.

205. Breneman JC, Lyden E, Pappo AS, Link MP, Anderson JR, Parham DM, et al. Prognostic Factors and Clinical Outcomes in Children and Adolescents With Metastatic Rhabdomyosarcoma—A Report From the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study IV. *Journal of Clinical Oncology* 2003;21(1):78-84.
206. Mackall CL, Rhee EH, Read EJ, Khuu HM, Leitman SF, Bernstein D, et al. A Pilot Study of Consolidative Immunotherapy in Patients with High-Risk Pediatric Sarcomas. *Clinical Cancer Research* 2008;14(15):4850-58.
207. Hashii Y, Sato E, Ohta H, Oka Y, Sugiyama H, Ozono K. WT1 peptide immunotherapy for cancer in children and young adults. *Pediatric Blood & Cancer* 2010;55(2):352-55.
208. Gattenloehner S, Dockhorn-Dworniczak B, Leuschner I, Vincent A, Müller-Hermelink H, Marx A. A Comparison of MyoD1 and Fetal Acetylcholine Receptor Expression in Childhood Tumors and Normal Tissues Implications for the Molecular Diagnosis of Minimal Disease in Rhabdomyosarcomas. *Journal of molecular diagnostics* 1999;1(1):23-31.
209. Gattenloehner S, Vincent A, Leuschner I, Tzartos S, Muller-Hermelink H, Kirchner T, et al. The fetal form of the acetylcholine receptor distinguishes rhabdomyosarcomas from other childhood tumors. *Am. J. Pathol.* 1998 152(2):437-44.
210. Changeux J-P, Galzi J-L, Devillers-Thiéry A, Bertrand D. The functional architecture of the acetylcholine nicotinic receptor explored by affinity labelling and site-directed mutagenesis. *Quarterly Reviews of Biophysics* 1992;25(04):395-432.
211. Itier V, Bertrand D. Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function. *FEBS letters* 2001;504(3):118-25.
212. Mishina M, Takai T, Imoto K, Noda M, Takahashi T, Numa S, et al. Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 1986;321(6068):406-11.
213. Missias AC, Chu GC, Klocke BJ, Sanes JR, Merlie JP. Maturation of the Acetylcholine Receptor in Skeletal Muscle: Regulation of the AChR γ -to- ϵ Switch. *Developmental Biology* 1996;179(1):223-38.
214. Hesselmanns LFGM, Jennekens FGI, Van Den Oord CJM, Veldman H, Vincent A. Development of innervation of skeletal muscle fibers in man: Relation to acetylcholine receptors. *The Anatomical Record* 1993;236(3):553-62.
215. Villarreal A, Sakmann B. Calcium permeability increase of endplate channels in rat muscle during postnatal development. *The Journal of Physiology* 1996;496(Pt 2):331-38.
216. Schluep M, Willcox N, Vincent A, Dhoot GK, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptors in human thymic myoid cells in situ: An immunohistological study. *Annals of Neurology* 1987;22(2):212-22.
217. Wakkach A, Poëa S, Chastre E, Gespach C, Lecerf F, De la Porte S, et al. Establishment of a Human Thymic Myoid Cell Line: Phenotypic and Functional Characteristics. *The American journal of pathology* 1999;155(4):1229-40.
218. Fraterman S, Khurana TS, Rubinstein NA. Identification of Acetylcholine Receptor Subunits Differentially Expressed in Singly and Multiply Innervated Fibers of Extraocular Muscles. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2006;47(9):3828-34.
219. Witzemann V, Barg B, Criado M, Stein E, Sakmann B. Developmental regulation of five subunit specific mRNAs encoding acetylcholine receptor subtypes in rat muscle. *FEBS letters* 1989;242(2):419-24.
220. Dalton P, Clover L, Wallerstein R, Stewart H, Genzel-Boroviczeny O, Dean A, et al. Fetal arthrogryposis and maternal serum antibodies. *Neuromuscular disorders : NMD* 2006;16(8):481-91.

-
221. Vincent A, Newland C, Beeson D, Riemersma S, Newsom-Davis J, Brueton L, et al. Arthrogryposis multiplex congenita with maternal autoantibodies specific for a fetal antigen. *The Lancet* 1995;346(8966):24-25.
222. Venrnet-der Garabedian B, Lacokava M, Eymard B, Morel E, Faltin M, Zajac J, et al. Association of neonatal myasthenia gravis with antibodies against fetal acetylcholine receptor. *J Clin Invest* 1994;94:555-59.
223. Gattenlöhner S, Marx A, Markfort B, Pscherer S, Landmeier S, Juergens H, et al. Rhabdomyosarcoma Lysis by T Cells Expressing a Human Autoantibody-Based Chimeric Receptor Targeting the Fetal Acetylcholine Receptor *Cancer Res* 2006;66:24-28.
224. Chang C, Chang J, Hsu N, Lin H, Chung C. Expression of CD80 and CD86 costimulatory molecules are potential markers for better survival in nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer* 2007;7(1):88.
225. Denfeld RW, Dietrich A, Wuttig C, Tanczos E, Weiss JM, Vanscheidt W, et al. In situ expression of B7 and CD28 receptor families in human malignant melanoma: Relevance for T-cell-mediated anti-tumor immunity. *International Journal of Cancer* 1995;62(3):259-65.
226. Gattenlöhner S, Marx A, Markfort B, Pscherer S, Landmeier S, Juergens H, et al. Rhabdomyosarcoma Lysis by T Cells Expressing a Human Autoantibody-Based Chimeric Receptor Targeting the Fetal Acetylcholine Receptor *Cancer Res* 2006;66:24-28.
227. Hombach A, Heuser C, Abken H. Generation, Expression, and Monitoring of Recombinant Immune Receptors for Use in Cellular Immunotherapy. *Recombinant Antibodies for Cancer Therapy* 2003;207(IV):365-81.
228. Hanahan D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 1983;166(4):557-80.
229. Birnboim H, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid. Res.* 1979;7:1513-23.
230. Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 1981;214(4526):1205-10.
231. Kuçi S, Rettinger E, Voss B, Weber G, Stais M, Kreyenberg H, et al. Efficient lysis of rhabdomyosarcoma cells by cytokine-induced killer cells: implications for adoptive immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2010;95((9)):1579-86.
232. Chen C, Okayama H. Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 1988;6(7):632-8.
233. Graham F, van der Eb A. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 1973;52:456-67.
234. Wigler M, Pellicer A, Silverstein S, Axel R. Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor *Cell* 1978;14(3):725-31.
235. Kim JA, Cho K, Shin MS, Lee WG, Jung N, Chung C, et al. A novel electroporation method using a capillary and wire-type electrode. *Biosensors and Bioelectronics* 2008;23(9):1353-60.
236. Wong T-K, Neumann E. Electric field mediated gene transfer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1982;107(2):584-87.
237. Potter H, Weir L, Leder P. Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(22):7161-5.
238. Weijtens M, Willemsen R, Hart E, Bolhuis R. A retroviral vector system 'STITCH' in combination with an optimized single chain antibody chimeric receptor gene structure

- allows efficient gene transduction and expression in human T lymphocytes. *Gene Therapy* 1998;5(9):1195-203.
239. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72(1-2):248-54.
240. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.
241. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 2001;25(4):402-08.
242. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit* 2007;37(2):120-26.
243. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 2002;30(9):e36.
244. Matthews I, Sims G, Ledwidge S, Stott D, Beeson D, Willcox N, et al. Antibodies to Acetylcholine Receptor in Parous Women with Myasthenia: Evidence for Immunization by Fetal Antigen. *Lab Invest* 2002;82(10):1407-17.
245. Musil LS, Frail DE, Merlie JP. The mammalian 43-kD acetylcholine receptor-associated protein (RAPsyn) is expressed in some nonmuscle cells. *The Journal of Cell Biology* 1989;108(5):1833-40.
246. Simon-Keller K, Paschen A, Eichmüller S, Gattenlöhner S, Barth S, Koscielniak E, et al. Adoptive T-Zell-Therapie des Rhabdomyosarkoms. *Der Pathologe* 2010;31(0):215-20.
247. Chmielewski M, Hombach A, Heuser C, Adams GP, Abken H. T Cell Activation by Antibody-Like Immunoreceptors: Increase in Affinity of the Single-Chain Fragment Domain above Threshold Does Not Increase T Cell Activation against Antigen-Positive Target Cells but Decreases Selectivity. *The Journal of Immunology* 2004;173:7647-53.
248. Gattenlöhner S, Müller-Hermelink H-K, Marx A. Polymerase Chain Reaction-Based Diagnosis of Rhabdomyosarcomas: Comparison of Fetal Type Acetylcholine Receptor Subunits and Myogenin. *Diagnostic Molecular Pathology* 1998;7(3):129-34.
249. Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 2004;104(9):2840-48.
250. Chmielewski M, Hombach A, Heuser C, Adams G, Abken H. T Cell Activation by Antibody-Like Immunoreceptors: Increase in Affinity of the Single-Chain Fragment Domain above Threshold Does Not Increase T Cell Activation against Antigen-Positive Target Cells but Decreases Selectivity. *J Immunol* 2004;173(12):7647-53.
251. Pievani A, Borleri G, Pende D, Moretta L, Rambaldi A, Golay J, et al. Dual-functional capability of CD3+CD56+ CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity. *Blood* 2011;118(12):3301-10.
252. Johnson JP. Cell Adhesion Molecules in the Development and Progression of Malignant Melanoma. *Cancer and Metastasis Reviews* 1999;18(3):345-57.
253. Smith MA, Morton CL, Phelps D, Girtman K, Neale G, Houghton PJ. SK-NEP-1 and Rh1 are Ewing family tumor lines. *Pediatric Blood & Cancer* 2008;50(3):703-06.
254. Casado J, Pawelec G, Morgado S, Sanchez-Correa B, Delgado E, Gayoso I, et al. Expression of adhesion molecules and ligands for activating and costimulatory receptors involved in cell-mediated cytotoxicity in a large panel of human melanoma cell lines. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2009;58(9):1517-26.
255. Terol MJ, Tormo M, Martinez-Climent JA, Marugan I, Benet I, Ferrandez A, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (s-ICAM-1/s-CD54) in diffuse large B-cell

- lymphoma: association with clinical characteristics and outcome. *Annals of Oncology* 2003;14(3):467-74.
256. Abdelrazik N, Fouda M, Zaghloul M, Abbas D. Serum Leval of Intracellular Adhesion Molecule-1 in Children with Malignant Lymphoma. *Medical Principles and Practice* 2008;17(3).
257. Toiyama Y, Miki C, Inoue Y, Okugawa Y, Koike Y, Yokoe T, et al. Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 as a Prognostic Marker for Stage II Colorectal Cancer Patients. *Annals of Surgical Oncology* 2008;15(6):1617-24.
258. Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, et al. B7-H3: A costimulatory molecule for T cell activation and IFN-[gamma] production. *Nat Immunol* 2001;2(3):269-74.
259. Fourcade J, Sun Z, Benallaoua M, Guillaume P, Luescher IF, Sander C, et al. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *The Journal of Experimental Medicine* 2010;207(10):2175-86.
260. Poëa-Guyon S, Christadoss P, Le Panse R, Guyon T, De Baets M, Wakkach A, et al. Effects of Cytokines on Acetylcholine Receptor Expression: Implications for Myasthenia Gravis. *The Journal of Immunology* 2005;174(10):5941-49.
261. Zhang MC, Liu HP, Demchik LL, Zhai YF, Yang DJ. LIGHT sensitizes IFN[gamma]-mediated apoptosis of HT-29 human carcinoma cells through both death receptor and mitochondria pathways. *Cell Res* 2004;14(2):117-24.
262. Bernabei P, Coccia EM, Rigamonti L, Bosticardo M, Forni G, Pestka S, et al. Interferon- γ receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death. *Journal of Leukocyte Biology* 2001;70(6):950-60.
263. Farrar MA, Schreiber RD. The Molecular Cell Biology of Interferon-gamma and its Receptor. *Annual Review of Immunology* 1993;11(1):571-611.
264. Farrar MA, Fernandez-Luna J, Schreiber RD. Identification of two regions within the cytoplasmic domain of the human interferon-gamma receptor required for function. *Journal of biological chemistry* 1991;266(29):19626-35.
265. Yerbes R, Palacios C, López-Rivas A. The therapeutic potential of TRAIL receptor signalling in cancer cells. *Clinical and Translational Oncology* 2011;13(12):839-47.
266. Sun H, Nikolovska-Coleska Z, Yang C-Y, Qian D, Lu J, Qiu S, et al. Design of Small-Molecule Peptidic and Nonpeptidic Smac Mimetics. *Accounts of Chemical Research* 2008;41(10):1264-77.
267. Dougan M, Dougan S, Slisz J, Firestone B, Vanneman M, Draganov D, et al. IAP inhibitors enhance co-stimulation to promote tumor immunity. *The Journal of Experimental Medicine* 2010;207(10):2195-206.
268. Nabzdyk CS, Lancero H, Nguyen KP, Salek S, Conte MS. RNA interference-mediated survivin gene knockdown induces growth arrest and reduced migration of vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2011;301(5):1841-49.
269. Lechler P, Schaumburger J, Köck F, Balakrishnan S, Doukas S, Prantl L, et al. The oncofetal gene survivin promotes cell proliferation and survival in primary human osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int* 2011;89(3):211-20.
270. Gaiser T, Becker MR, Habel A, Reuss DE, Ehemann V, Rami A, et al. TRAIL-mediated apoptosis in malignant glioma cells is augmented by celecoxib through proteasomal degradation of survivin. *Neuroscience Letters* 2008;442(2):109-13.
271. Yoshinaka R, Shibata M-A, Morimoto J, Tanigawa N, Otsuki Y. COX-2 Inhibitor Celecoxib Suppresses Tumor Growth and Lung Metastasis of a Murine Mammary Cancer. *Anticancer Research* 2006;26(6B):4245-54.

-
272. Zheng X, Cui X-X, Avila GE, Huang M-T, Liu Y, Patel J, et al. Atorvastatin and Celecoxib Inhibit Prostate PC-3 Tumors in Immunodeficient Mice. *Clinical Cancer Research* 2007;13(18):5480-87.
273. Raut CP, Nawrocki S, Lashinger LM, Davis DW, Khanbolooki S, Xiong H, et al. Celecoxib inhibits angiogenesis by inducing endothelial cell apoptosis in human pancreatic tumor xenografts. *Cancer Biology & Therapy* 2004;3(12):1217-24.
274. Stevens MCG, Rey A, Bouvet N, Ellershaw C, Flamant F, Habrand JL, et al. Treatment of Nonmetastatic Rhabdomyosarcoma in Childhood and Adolescence: Third Study of the International Society of Paediatric Oncology—SIOP Malignant Mesenchymal Tumor 89. *Journal of Clinical Oncology* 2005;23(12):2618-28.
275. Admiraal R, van der Paardt M, Kobes J, Kremer L, Bisogno G, Merks J. High dose chemotherapy for children and young adults with stage IV rhabdomyosarcoma. *The Cochrane Library* 2010(12).
276. Seitz G, Warmann S, Vokuhl C, Heitmann H, Treuner C, Leuschner I, et al. Effects of standard chemotherapy on tumor growth and regulation of multidrug resistance genes and proteins in childhood rhabdomyosarcoma. *Pediatric Surgery International* 2007;23(5):431-39.
277. Oue T, Yoneda A, Uehara S, Yamanaka H, Fukuzawa M. Increased expression of multidrug resistance-associated genes after chemotherapy in pediatric solid malignancies. *Journal of Pediatric Surgery* 2009;44(2):377-80.
278. Melguizo C, Prados J, Rama A, Ortiz R, Álvarez P, Fernández J, et al. Multidrug resistance and rhabdomyosarcoma. *Oncology reports* 2011;26(4):755-61.
279. Spunt SL, Smith LM, Ruymann FB, Qualman SJ, Donaldson SS, Rodeberg DA, et al. Cyclophosphamide Dose Intensification during Induction Therapy for Intermediate-Risk Pediatric Rhabdomyosarcoma Is Feasible but Does Not Improve Outcome. *Clinical Cancer Research* 2004;10(18):6072-79.
280. Doelken R, Weigel S, Schueler F, Doelken G, Beck JF. Poor Outcome of two Children with Relapsed State Stage IV Alveolar Rhabdomyosarcoma after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Pediatric Hematology-Oncology* 2005;22(8):699-703.
281. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *New England Journal of Medicine* 2011;365(8):725-33.
282. Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, et al. T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia. *Science Translational Medicine* 2011;3(95).
283. Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Current Opinion in Immunology* 2009;21(2):233-40.
284. Till BG, Jensen MC, Wang J, Qian X, Gopal AK, Maloney DG, et al. CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood* 2012.
285. Cho D, Shook DR, Shimasaki N, Chang Y-H, Fujisaki H, Campana D. Cytotoxicity of Activated Natural Killer Cells against Pediatric Solid Tumors *Clinical Cancer Research* 2010 16:3901-09.
286. Gattenlöhner S, Schneider C, Thamer C, Klein R, Roggendorf W, Gohlke F, et al. Expression of foetal type acetylcholine receptor is restricted to type 1 muscle fibres in human neuromuscular disorders. *Brain* 2002;125(6):1309-19.
287. Gattenlöhner S, Jörißen H, Huhn M, Vincent A, Beeson D, Tzartos S, et al. A Human Recombinant Autoantibody-Based Immunotoxin Specific for the Fetal Acetylcholine Receptor Inhibits Rhabdomyosarcoma Growth In Vitro and in a Murine Transplantation Model. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010.

-
288. Vincent A, Jacobson L, Shillito P. Response to human acetylcholine receptor α 138–199: determinant spreading initiates autoimmunity to self-antigen in rabbits. *Immunology Letters* 1994;39(3):269-75.
289. Hombach A, Schneider C, Sent D, Koch D, Willemsen RA, Diehl V, et al. An entirely humanized CD3 ζ -chain signaling receptor that directs peripheral blood t cells to specific lysis of carcinoembryonic antigen–positive tumor cells. *International Journal of Cancer* 2000;88(1):115-20.
290. Chmielewski M, Hombach AA, Abken H. CD28 cosignalling does not affect the activation threshold in a chimeric antigen receptor-redredirected T-cell attack. *Gene Ther* 2011;18(1):62-72.
291. Cooper LJN, Topp MS, Serrano LM, Gonzalez S, Chang W-C, Naranjo A, et al. T-cell clones can be rendered specific for CD19: toward the selective augmentation of the graft-versus-B–lineage leukemia effect. *Blood* 2003;101(4):1637-44.
292. Till BG, Jensen MC, Wang J, Chen EY, Wood BL, Greisman HA, et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood* 2008;112(6):2261-71.
293. Liu L, Sun M, Wang Z. Adoptive T-cell therapy of B-cell malignancies: Conventional and physiological chimeric antigen receptors. *Cancer letters* 2012;316(1):1-5.
294. Dotti G, Savoldo B, Brenner M. Fifteen Years of Gene Therapy Based on Chimeric Antigen Receptors: “Are We Nearly There Yet?”. *Human Gene Therapy* 2009;20(11):1229-39.
295. Brocker T. Chimeric Fv- ζ or Fv- ϵ receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells. *Blood* 2000;96(5):1999-2001.
296. Koehler P, Schmidt P, Hombach AA, Hallek M, Abken H. Engineered T Cells for the Adoptive Therapy of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Advances in Hematology* 2012.
297. Finney HM, Akbar AN, Lawson ADG. Activation of Resting Human Primary T Cells with Chimeric Receptors: Costimulation from CD28, Inducible Costimulator, CD134, and CD137 in Series with Signals from the TCR ζ Chain. *The Journal of Immunology* 2004;172(1):104-13.
298. Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-xL. *Immunity* 1995;3(1):87-98.
299. Lamers CHJ, Gratama JW, Warnaar SO, Stoter G, Bolhuis RLH. Inhibition of bispecific monoclonal antibody (bsAb)-targeted cytotoxicity by human anti-mouse antibodies in ovarian carcinoma patients treated with bsAb-targeted activated T-lymphocytes. *International Journal of Cancer* 1995;60(4):450-57.
300. Jensen MC, Popplewell L, Cooper LJ, DiGiusto D, Kalos M, Ostberg JR, et al. Antitransgene Rejection Responses Contribute to Attenuated Persistence of Adoptively Transferred CD20/CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor Redirected T Cells in Humans. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2010;16(9):1245-56.
301. Maliar A, Servais C, Waks T, Chmielewski M, Lavy R, Altevogt P, et al. Redirected T Cells That Target Pancreatic Adenocarcinoma Antigens Eliminate Tumors and Metastases in Mice. *Gastroenterology* 2012(0).
302. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case Report of a Serious Adverse Event Following the Administration of T Cells Transduced With a Chimeric Antigen Receptor Recognizing ERBB2. *Mol Ther* 2010;18(4):843-51.

-
303. Joshi PS, Liu J-Q, Wang Y, Chang X, Richards J, Assarsson E, et al. Cytokine-induced killer T cells kill immature dendritic cells by TCR-independent and perforin-dependent mechanisms. *Journal of Leukocyte Biology* 2006;80(6):1345-53.
304. Gütgemann S, Frank S, Strehl J, Schmidt-Wolf I. Cytokine-induced killer cells are type II natural killer cells. *Ger Med Sci* 2007;10(5).
305. Seino K-i, Motohashi S, Fujisawa T, Nakayama T, Taniguchi M. Natural killer T cell-mediated antitumor immune responses and their clinical applications. *Cancer Science* 2006;97(9):807-12.
306. Van Kaer L, Parekh V, Wu L. Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity. *Cell and Tissue Research*;343(1):43-55.
307. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol*;12(4):239-52.
308. Rettinger E, Meyer V, Kreyenberg H, Volk A, Kuci S, Willasch A, et al. Cytotoxic capacity of IL-15-stimulated cytokine-induced killer cells against human acute myeloid leukemia and rhabdomyosarcoma in humanized preclinical mouse models. *Frontiers in Oncology* 2012;2.
309. Seeger JM, Schmidt P, Brinkmann K, Hombach AA, Coutelle O, Zigrino P, et al. The Proteasome Inhibitor Bortezomib Sensitizes Melanoma Cells toward Adoptive CTL Attack *Cancer Res* 2010;70:1825-34.
310. Greenwald RJ, Latchman YE, Sharpe AH. Negative co-receptors on lymphocytes. *Current Opinion in Immunology* 2002;14(3):391-96.
311. Wang S, Chen L. Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. *Microbes and Infection* 2004;6(8):759-66.
312. Wiendl H, Behrens L, Maier S, Johnson MA, Weiss EH, Hohlfeld R. Muscle fibers in inflammatory myopathies and cultured myoblasts express the nonclassical major histocompatibility antigen HLA-G. *Annals of Neurology* 2000;48(4):679-84.
313. Michaelis D, Goebels N, Hohlfeld R. Constitutive and cytokine-induced expression of human leukocyte antigens and cell adhesion molecules by human myotubes. *American Journal of Pathology* 1993;143(4):1142-9.
314. Carosella ED, Paul P, Moreau P, Rouas-Freiss N. HLA-G and HLA-E: fundamental and pathophysiological aspects. *Immunology Today* 2000;21(11):532-34.
315. Seliger B, Abken H, Ferrone S. HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity. *Trends in Immunology* 2003;24(2):82-87.
316. Martin-Orozco N, Li Y, Wang Y, Liu S, Hwu P, Liu Y-J, et al. Melanoma Cells Express ICOS Ligand to Promote the Activation and Expansion of T-Regulatory Cells. *Cancer Research* 2010;70(23):9581-90.
317. Mechttersheimer G, Staudter M, Möller P. Expression of the Natural Killer Cell-associated Antigens CD56 and CD57 in Human Neural and Striated Muscle Cells and in Their Tumors. *Cancer Research* 1991;51(4):1300-07.
318. Rabinowitz JE, Rutishauser U, Magnuson T. Targeted mutation of Ncam to produce a secreted molecule results in a dominant embryonic lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996;93(13):6421-24.
319. Xiong X, Li Y, Wang L, Wei J, Ma L, Shen X. Expression of ICAM-1 (CD54) in pediatric tumor and acute leukemia and its clinic significance in immunotherapy with CIK cell. *Journal of experimental hematology/Chinese association of pathophysiology* 2012;20(2):282-6.
320. Leite MI, Jacob S, Viegas S, Cossins J, Clover L, Morgan BP, et al. IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis. *Brain* 2008;131(7):1940-52.

-
321. Giavazzi R, Chirivi RGS, Garofalo A, Rambaldi A, Hemingway I, Pigott R, et al. Soluble Intercellular Adhesion Molecule 1 Is Released by Human Melanoma Cells and Is Associated with Tumor Growth in Nude Mice. *Cancer Research* 1992;52(9):2628-30.
322. Alexiou D, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Zbar A, Kremmyda A, Bramis I, et al. Serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2001;37(18):2392-97.
323. Liu Y, Chen B, She X. A clinical evaluation of serum concentrations of intercellular adhesion molecule-1 in patients with gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology* 1998;4(3):225-27.
324. Schröder C, Witzel I, Müller V, Krenkel S, Wirtz R, Jänicke F, et al. Prognostic value of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression in breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2011;137(8):1193-201.
325. Rieckmann P, Michel U, Albrecht M, Brück W, Wöckel L, Felgenhauer K. Soluble forms of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) block lymphocyte attachment to cerebral endothelial cells. *Journal of Neuroimmunology* 1995;60(1):9-15.
326. Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacological Reports* 2009;61(1):22-32.
327. Pui CH, Luo X, Evans W, Martin S, Rugg A, Wilimas J, et al. Serum intercellular adhesion molecule-1 in childhood malignancy. *Blood* 1993;82(3):895-98.
328. Wiendl H, Mitsdoerffer M, Schneider D, Chen L, Lochmüller H, Melms A, et al. Human muscle cells express a B7-related molecule, B7-H1, with strong negative immune regulatory potential: a novel mechanism of counterbalancing the immune attack in idiopathic inflammatory myopathies. *The FASEB Journal* 2003.
329. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. THE B7 FAMILY REVISITED. *Annual Review of Immunology* 2005;23(1):515-48.
330. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *The Journal of Experimental Medicine* 2000;192(7):1027-34.
331. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 Expression on Non-Small Cell Lung Cancer Cells and Its Relationship with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their PD-1 Expression. *Clinical Cancer Research* 2004;10(15):5094-100.
332. Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, et al. Clinical Significance and Therapeutic Potential of the Programmed Death-1 Ligand/Programmed Death-1 Pathway in Human Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research* 2007;13(7):2151-57.
333. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* 2010;116(7):1757-66.
334. Strome SE, Dong H, Tamura H, Voss SG, Flies DB, Tamada K, et al. B7-H1 Blockade Augments Adoptive T-Cell Immunotherapy for Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research* 2003;63(19):6501-05.
335. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 2009;114(8):1537-44.
336. Chen Y, Tekle C, Fodstad O. The immunoregulatory protein human B7H3 is a tumor associated antigen that regulates tumor cell migration and invasion. *Current Cancer Drug Targets* 2008;8(5):404-13.

-
337. Sun Y, Wang Y, Zhao J, Gu M, Giscombe R, Lefvert AK, et al. B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2006;53(2):143-51.
338. Lemke D, Pfenning P-N, Sahm F, Klein A-C, Kempf T, Warnken U, et al. Costimulatory Protein 4IgB7H3 Drives the Malignant Phenotype of Glioblastoma by Mediating Immune Escape and Invasiveness. *Clinical Cancer Research* 2012;18(1):105-17.
339. Yoshimura A, Nishinakamura H, Matsumura Y, Hanada T. Negative regulation of cytokine signaling and immune responses by SOCS proteins. *Arthritis Research & Therapy* 2005;7(3):100 - 10.
340. van der Stoep N, Biesta P, Quinten E, van den Elsen PJ. Lack of ifn- γ -mediated induction of the class II transactivator (CIITA) through promoter methylation is predominantly found in developmental tumor cell lines. *International Journal of Cancer* 2002;97(4):501-07.
341. Chen B, He L, Savell VH, Jenkins JJ, Parham DM. Inhibition of the interferon-gamma/signal transducers and activators of transcription (STAT) pathway by hypermethylation at a STAT-binding site in the p21WAF1 promoter region. *Cancer Res* 2000;60:3290-98.
342. Londhe P, Zhu B, Abraham J, Keller C, Davie J. CIITA is silenced by epigenetic mechanisms that prevent the recruitment of transactivating factors in rhabdomyosarcoma cells. *International Journal of Cancer* 2011:n/a-n/a.
343. Herrmann TL, Agrawal RS, Connolly SF, McCaffrey RL, Schlomann J, Kusner DJ. MHC Class II levels and intracellular localization in human dendritic cells are regulated by calmodulin kinase II. *Journal of Leukocyte Biology* 2007;82(3):686-99.
344. Hu G, Gong A-Y, Liu J, Zhou R, Deng C, Chen X-M. miR-221 suppresses ICAM-1 translation and regulates interferon- γ -induced ICAM-1 expression in human cholangiocytes. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 2010;298(4):G542-G50.
345. Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN γ receptors. *Immunity* 1994;1(6):447-56.
346. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, et al. Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998;95(13):7556-61.
347. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006;6(11):836-48.
348. Qin Z, Schwartzkopff J, Pradera F, Kammertoens T, Seliger B, Pircher H, et al. A Critical Requirement of Interferon γ -mediated Angiostasis for Tumor Rejection by CD8 $^{+}$ T Cells. *Cancer Research* 2003;63(14):4095-100.
349. Fabregat I, Roncero C, Fernández M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver International* 2007;27(2):155-62.
350. Ashkenazi A, Holland P, Eckhardt SG. Ligand-Based Targeting of Apoptosis in Cancer: The Potential of Recombinant Human Apoptosis Ligand 2/Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (rhApo2L/TRAIL). *Journal of Clinical Oncology* 2008;26(21):3621-30.
351. Cretney E, Takeda K, Yagita H, Glaccum M, Peschon JJ, Smyth MJ. Increased Susceptibility to Tumor Initiation and Metastasis in TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Deficient Mice. *The Journal of Immunology* 2002;168(3):1356-61.
352. Schmaltz C, Alpdogan O, Kappel BJ, Muriglan SJ, Rotolo JA, Ongchin J, et al. T cells require TRAIL for optimal graft-versus-tumor activity. *Nat Med* 2002;8(12):1433-37.
353. Herbst RS, Eckhardt SG, Kurzrock R, Ebbinghaus S, O'Dwyer PJ, Gordon MS, et al. Phase I Dose-Escalation Study of Recombinant Human Apo2L/TRAIL, a Dual

- Proapoptotic Receptor Agonist, in Patients With Advanced Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2010;28(17):2839-46.
354. Soria J-C, Smit E, Khayat D, Besse B, Yang X, Hsu C-P, et al. Phase 1b Study of Dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in Combination With Paclitaxel, Carboplatin, and Bevacizumab in Patients With Advanced Non-Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2010;28(9):1527-33.
355. Soria J-C, Márk Z, Zatloukal P, Szima B, Albert I, Juhász E, et al. Randomized Phase II Study of Dulanermin in Combination With Paclitaxel, Carboplatin, and Bevacizumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2011;29(33):4442-51.
356. Jacquemin G, Shirley S, Micheau O. Combining naturally occurring polyphenols with TNF-related apoptosis-inducing ligand: a promising approach to kill resistant cancer cells? *Cellular and Molecular Life Sciences* 2010;67(18):3115-30.
357. Ehrenschrwender M, Wajant H, Grewal IS. The Role of FasL and Fas in Health and Disease Therapeutic Targets of the TNF Superfamily: Springer New York, 2009:64-93.
358. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1993;364(6440):806-09.
359. Huang DCS, Hahne M, Schroeter M, Frei K, Fontana A, Villunger A, et al. Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-xL. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999;96(26):14871-76.
360. Bullani R, Wehrli P, Viard-Leveugle D, Rimoldi D, Cerottini J-C, Saurat J-H, et al. Frequent downregulation of Fas (CD95) expression and function in melanoma. *Melanoma Research* 2002;12:263-70.
361. Xu X, Fu X-Y, Plate J, Chong AS-F. IFN- γ Induces Cell Growth Inhibition by Fas-mediated Apoptosis: Requirement of STAT1 Protein for Up-Regulation of Fas and FasL Expression. *Cancer Research* 1998;58(13):2832-37.
362. Yang D, Stewart TJ, Smith KK, Georgi D, Abrams SI, Liu K. Downregulation of IFN- γ R in association with loss of Fas function is linked to tumor progression. *International Journal of Cancer* 2008;122(2):350-62.
363. Wachtel M, Schäfer BW. Targets for cancer therapy in childhood sarcomas. *Cancer treatment reviews* 2010;36(4):318-27.
364. Fulda S. Exploiting apoptosis pathways for the treatment of pediatric cancers. *Pediatric Blood & Cancer* 2009;53(4):533-36.
365. Caldas H, Holloway M, Hall B, Qualman S, Altura R. Survivin-directed RNA interference cocktail is a potent suppressor of tumour growth in vivo *J Med Genet* 2006;43:119-28
366. Singh S, Vinson C, Gurley CM, Nolen GT, Beggs ML, Nagarajan R, et al. Impaired Wnt Signaling in Embryonal Rhabdomyosarcoma Cells from p53/c-fos Double Mutant Mice. *Am J Pathol* 2010;177(4):2055-66.
367. Izeradjene K, Douglas L, Delaney AB, Houghton JA. Casein Kinase I Attenuates Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Induced Apoptosis by Regulating the Recruitment of Fas-Associated Death Domain and Procaspase-8 to the Death-Inducing Signaling Complex *Cancer Res* 2004;64:8036-44.
368. Wei C, Ball S, Lin L, Liu A, Fuchs J, Li P, et al. Two small molecule compounds, LLL12 and FLLL32, exhibit potent inhibitory activity on STAT3 in human rhabdomyosarcoma cells. *Int J Oncol*. 2011;38(1):279-85.
369. Mayeenuddin LH, Yu Y, Kang Z, Helman LJ, Cao L. Insulin-like growth factor 1 receptor antibody induces rhabdomyosarcoma cell death via a process involving AKT and Bcl-xL. *Oncogene* 2010.

-
370. Barnhart B, Lam J, Young R, Houghton P, Keith B, Simon M. Effects of 4E-BP1 expression on hypoxic cell cycle inhibition and tumor cell proliferation and survival. *Cancer Biol Ther* 2008; 7(9):1441-49.
371. Margue C, Bernasconi M, Barr F, Schäfer B. Transcriptional modulation of the anti-apoptotic protein BCL-XL by the paired box transcription factors PAX3 and PAX3/FKHR. *Oncogene* 2000 19((25)):2921-9.
372. Zhou H, Shen T, Luo Y, Liu L, Chen W, Xu B, et al. The antitumor activity of the fungicide ciclopirox. *International Journal of Cancer* 2010;127(10):2467-77.
373. Gordon GJ, Mani M, Mukhopadhyay L, Dong L, Edenfield HR, Glickman JN, et al. Expression patterns of inhibitor of apoptosis proteins in malignant pleural mesothelioma. *The Journal of Pathology* 2007;211(4):447-54.
374. Vince JE, Wong WW-L, Khan N, Feltham R, Chau D, Ahmed AU, et al. IAP Antagonists Target cIAP1 to Induce TNF \pm -Dependent Apoptosis. *Cell* 2007;131(4):682-93.
375. Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* 2006;7(10):988-94.
376. Samuel T, Welsh K, Lober T, Togo SH, Zapata JM, Reed JC. Distinct BIR Domains of cIAP1 Mediate Binding to and Ubiquitination of Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 2 and Second Mitochondrial Activator of Caspases. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281(2):1080-90.
377. Li X, Yang Y, Ashwell JD. TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 2002;416(6878):345-47.
378. Eckelman BP, Salvesen GS. The Human Anti-apoptotic Proteins cIAP1 and cIAP2 Bind but Do Not Inhibit Caspases. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281(6):3254-60.
379. Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integrative Biology* 2011;3(4):279-96.
380. LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH, Plenchette S, Baird S, Korneluk RG. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 2008;27(48):6252-75.
381. Ekeblad S, Lejonklou M, Stålberg P, Skogseid B. Prognostic Relevance of Survivin in Pancreatic Endocrine Tumors. *World Journal of Surgery*:1-8.
382. Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, Fitz-simons N, McDermott EW, Hill AD, et al. Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer* 2003;88(7):1077-83.
383. Fields AC, Cotsonis G, Sexton D, Santoianni R, Cohen C. Survivin expression in hepatocellular carcinoma: correlation with proliferation, prognostic parameters, and outcome. *Mod Pathol* 2004;17(11):1378-85.
384. Cohen C, Lohmann CM, Cotsonis G, Lawson D, Santoianni R. Survivin Expression in Ovarian Carcinoma: Correlation with Apoptotic Markers and Prognosis. *Mod Pathol* 2003;16(6):574-83.
385. Chen D, Huerta S. Smac mimetics as new cancer therapeutics. *Anti-Cancer Drugs* 2009;20(8):646-58.
386. Varfolomeev E, Blankenship JW, Wayson SM, Fedorova AV, Kayagaki N, Garg P, et al. IAP Antagonists Induce Autoubiquitination of c-IAPs, NF- κ B Activation, and TNF α -Dependent Apoptosis. *Cell* 2007;131(4):669-81.
387. Petersen SL, Peyton M, Minna JD, Wang X. Overcoming cancer cell resistance to Smac mimetic induced apoptosis by modulating cIAP-2 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010;107(26):11936-41.
388. Gordon GJ, Mani M, Mukhopadhyay L, Dong L, Yeap BY, Sugarbaker DJ, et al. Inhibitor of apoptosis proteins are regulated by tumour necrosis factor- α in malignant pleural mesothelioma. *The Journal of Pathology* 2007;211(4):439-46.

-
389. Rödel F, Reichert S, Sprenger T, Gaipf US, Mirsch J, Liersch T, et al. The Role of Survivin for Radiation Oncology: Moving Beyond Apoptosis Inhibition. *Curr Med Chem*. 2010;Epub ahead of print.
390. Carrasco RA, Stamm NB, Marcusson E, Sandusky G, Iversen P, Patel BKR. Antisense Inhibition of Survivin Expression as a Cancer Therapeutic. *Molecular Cancer Therapeutics*;10(2):221-32.
391. Kashkar H, Deggerich A, Seeger J-M, Yazdanpanah B, Wiegmann K, Haubert D, et al. NF- κ B-independent down-regulation of XIAP by bortezomib sensitizes HL B cells against cytotoxic drugs. *Blood* 2007;109(9):3982-88.
392. Reed S, Li H, Li C, Lin J. Celecoxib inhibits STAT3 phosphorylation and suppresses cell migration and colony forming ability in rhabdomyosarcoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*;In Press, Corrected Proof.
393. Krysan K, Merchant FH, Zhu L, Dohadwala M, Luo J, Lin Y, et al. COX-2-dependent stabilization of survivin in non-small cell lung cancer. *The FASEB Journal* 2003.
394. Mateos J. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2 (COX-2), celecoxib and parecoxib: a systematic review. *Drugs Today* 2010;46 (Suppl A:1-25).
395. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2009;4(1):22.
396. Veltman J, Lambers M, van Nimwegen M, Hendriks R, Hoogsteden H, Aerts J, et al. COX-2 inhibition improves immunotherapy and is associated with decreased numbers of myeloid-derived suppressor cells in mesothelioma. Celecoxib influences MDSC function. *BMC Cancer* 2010;10(1):464.
397. Tanioka M, Nokihara H, Yamamoto N, Yamada Y, Yamada K, Goto Y, et al. Phase I study of LY2181308, an antisense oligonucleotide against survivin, in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2010;1-7.
398. Tolcher A, Mita A, Lewis L, Garrett C, Till E, Daud A, et al. Phase I and Pharmacokinetic Study of YM155, a Small-Molecule Inhibitor of Survivin *JCO* 2008;5198-203.
399. Talbot DC, Ranson M, Davies J, Lahn M, Callies S, André V, et al. Tumor Survivin Is Downregulated by the Antisense Oligonucleotide LY2181308: A Proof-of-Concept, First-in-Human Dose Study. *Clinical Cancer Research* 2010;16(24):6150-58.
400. Plescia J, Salz W, Xia F, Pennati M, Zaffaroni N, Daidone MG, et al. Rational design of shepherdin, a novel anticancer agent. *Cancer cell* 2005;7(5):457-68.
401. Turatti F, Figini M, Balladore E, Alberti P, Casalini P, Marks JD, et al. Redirected Activity of Human Antitumor Chimeric Immune Receptors is Governed by Antigen and Receptor Expression Levels and Affinity of Interaction. *Journal of Immunotherapy* 2007;30(7):684-93.
402. Kawa S, Onda M, Ho M, Kreitman RJ, Bera TK, Pastan I. The improvement of an anti-CD22 immunotoxin: Conversion to single-chain and disulfide stabilized form and affinity maturation by alanine scan. *MABs* 2011;3(5):479-86.
403. Onda M, Beers R, Xiang L, Lee B, Weldon JE, Kreitman RJ, et al. Recombinant immunotoxin against B-cell malignancies with no immunogenicity in mice by removal of B-cell epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;108(14):5742-47.
404. Koseki H. Homogenous junctional sequence of the V14+ T-cell antigen receptor [alpha]-chain expanded in unprimed mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1990;87:5248-52.

6 ANHANG

6.1 Vektorkarten

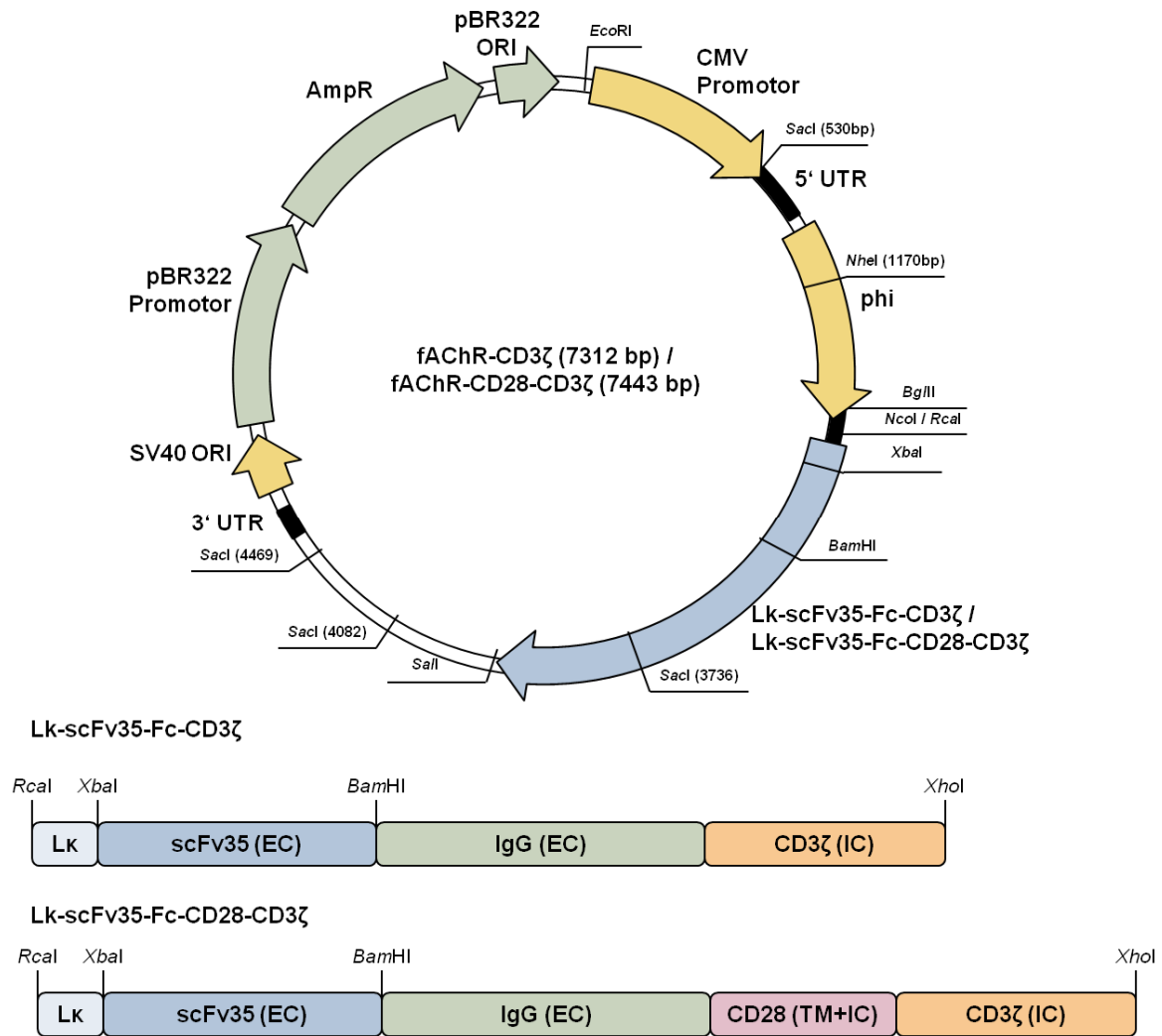


Abbildung 6.1: Schematischer Aufbau der in der Arbeit verwendeten pBullet-Vektoren inklusive der im Rahmen der Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen.

6.2 Gewebeproben

Die unter Abschnitt 6.2 aufgeführten Tabellen bieten eine Zusammenfassung der im Rahmen der Arbeit verwendeten Frisch- und Paraffin-Gewebeproben von RMS- und Muskel-Biopsien. Die entsprechenden Genehmigungen der zuständigen Ethikkommission liegen ebenso vor, wie eine unterschriebene Einverständniserklärung der Patienten bzw. der jeweiligen Erziehungsberechtigten.

Tabelle 6.1: Im Rahmen der Arbeit verwendete RMS-Biopsien (Paraffin)

	<i>ERMS</i> <i>n</i> = 8	<i>ARMS</i> <i>n</i> = 2
Alter (Jahren)	6,63 ($\pm 2,6$)	n.b.
Geschlecht	w = 4; m = 4	w = 1; n.b. = 1

w – weiblich, m – männlich, n.b. – nicht bekannt

Tabelle 6.2: Im Rahmen der Arbeit verwendete RMS-Biopsien (Frischgewebe)

	<i>ERMS</i> <i>n</i> = 6
Alter (Jahren)	n.b.
Geschlecht	w = 2; m = 1; n.b. = 3

w – weiblich, m – männlich, n.b. – nicht bekannt

Tabelle 6.3: Im Rahmen der Arbeit verwendete RMS-Biopsien bei denen ein „follow up“ verfügbar war (nur RNA)

	<i>ERMS</i> <i>n</i> = 13	<i>ARMS</i> <i>n</i> = 10
Alter (Jahren)	4,3 ($\pm 3,0$)	12,3 ($\pm 3,4$)
Geschlecht	w = 6; m = 7	w = 6; m = 3; n.b. = 1
Tumor-Größe	≤ 5 cm = 2; > 5 cm = 9; n.b. = 2	≤ 5 cm = 1; > 5 cm = 8; n.b. = 1
Tumor-Stadium	I = 1; II = 3; III = 5; IV = 3; n.b. = 1	III = 3; IV = 7
Überlebenszeit (Jahren)	4,0 ($\pm 3,4$)	2,1 ($\pm 0,9$)
Krankheitsfreies- Überleben (Jahren)	3,4 ($\pm 3,5$)	1,5 ($\pm 1,2$)

w – weiblich, m – männlich, n.b. – nicht bekannt

Tabelle 6.4: Im Rahmen der Arbeit verwendete Muskel-Biopsien (Paraffin und Frischgewebe)

	<i>Muskel (Paraffin)</i> <i>n = 5</i>	<i>Muskel (Frischgewebe)</i> <i>n = 5</i>
Alter (Jahren)	36,8 ($\pm 15,6$)	41,2 ($\pm 18,7$)
Geschlecht	w = 3; m = 2	w = 3; m = 2

w – weiblich, m – männlich

6.3 Nachweis der Pax3-FKHR Translokation

Die verwendeten Zelllinien und Gewebe wurden hinsichtlich der beiden bekanntesten ARMS Translokationen, Pax3-FKHR und Pax7-FKHR, untersucht. Gemäß der Literatur wurde bei CRL2061, RH30 und RH41 die beschriebene Pax3-FKHR Translokation nachgewiesen, während bei der Translokations-negativen Zelllinie FLOH1 und den beiden ERMS-Linien RD6 und TE671 keine Bande detektierbar war. Im Fall der verwendeten Frischgewebe wiesen 10 Proben eine Translokation auf (ARMS), die restlichen 16 waren negativ (ERMS) (Abbildung 6.2; 6 ERMS Proben sind hier nicht gezeigt).

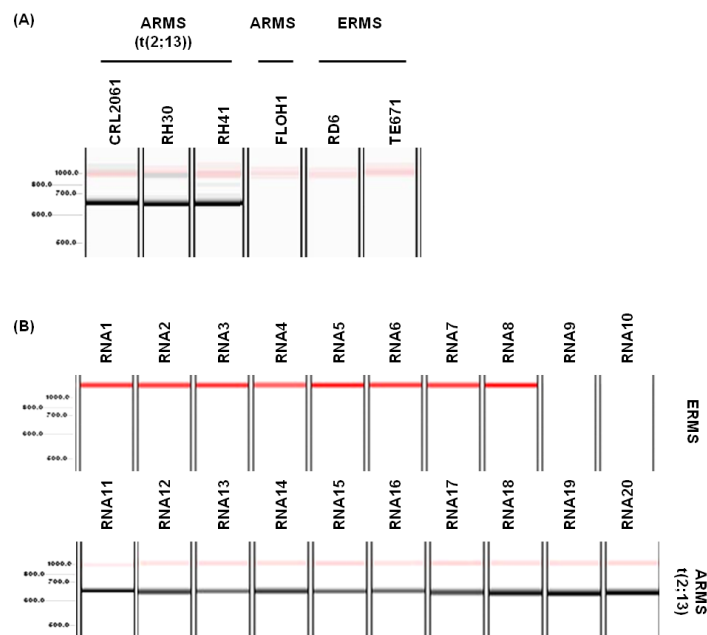


Abbildung 6.2: Pax3-FKHR Translokation (t(2;13)). (A) bei den im Rahmen der Arbeit verwendeten Zelllinien und (B) den untersuchten RMS-Frischgewebe-Biopsien

6.4 Chemikalienliste

Acrylamid (Rotiporese® Gel 30)

Carl Roth GmbH

Agar-Agar

Carl Roth GmbH

Ampicillin	Merck Millipore
BSA	PAA
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich
Glaswolle silanisiert	Supelco
Kanamycin	Carl Roth GmbH
LB broth	Sigma Aldrich
SEKem [®] LE Agarose	Lonza
TEMED	
(N, N, N', N' Tetramethylethylendiamin)	Carl Roth GmbH

Die übrigen in der Arbeit verwendeten Feinchemikalien wurden von den Firmen Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland) und Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

6.5 Geräteliste

Brutschrank	Certomax [®]	Braun Biotech
Brutschrank	WTC	Binder
Chemilumineszenz System	Chemismart 5100	Peqlab
CO ₂ Inkubator	HERAcell 150	Heraeus
Durchflusscytometer	Calibur	Becton Dickinson
Elektrophoresekammer	BlueMarine TM 200	Serva
Elektrophoresekammer	MiniProtein [®] Tetra Electrophoresis	Biorad
Elektroporator	NEON TM	Invitrogen
Färbe-Roboter	AutostainerPlus	Dako
Fluoreszenzmikroskop	Axiophot2	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop	BX41	Olympus
Heizrührer	MR2000	Heidolph
Heizrührer	MR2002	Heidolph
Inverses Mikroskop	DMIRB	Leica
Mikroskop	DMIL	Leica
Mikrotiterplatten Lesegerät	Infinite [®] 200 Pro	Tecan
Netzgerät	E455	Consort
Netzgerät	PowerPac 200	BioRad
pH-Meter	pH320	WTW
Pipettierhilfe	Accu-jet [®] pro	Brand

Pipettierhilfe	pipetus®	Hirschmann
RealTime Analyzer	StepOnePlus PCR System	Applied Biosystems
Schlittenmikrotom	SM2000R	Leica
Sequenzierer	3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Sicherheitswerkbank	HERAsafe KS9	Hereaus
Spektrometer	ND100 NanoDrop Spektrometer	Peqlab
Thermocycler	Gradient	Biometra
Thermocycler	Primus 96 Plus	MWG Biotech
Thermocycler	T1	Biometra
Thermomixer	comfort	Eppendorf
Transferkammer	MiniTransblot Cell	Biorad
Transilluminator		Peqlab
Vortex	Reax top	Heidolph
Vortex	VF2	Janke&Kunkel
Waage		Sartorius
Waage	BP3015	Sartorius
Waage	SPB63	Scaltec
Wippschüttler	Polymax1040	Heidolph
Wippschüttler	WT12	Biometra
Zentrifuge	5415R	Eppendorf
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Heraeus
Zentrifuge	Minifuge GL	Heraeus

VERÖFFENTLICHUNGSNACHWEIS

Veröffentlichungen:

Simon-Keller K, Paschen A, Eichmüller S, Gattenlöhner S, Barth S, Koscielniak E, Leuschner I, Ströbel P, Hombach A, Abken H, Marx A; Adoptive T cell therapy of rhabdomyosarcoma; Der Pathologe 2010; 31; 215-220

Simon-Keller K, Mößinger K, Bohlender AL, Ströbel P, Marx A; Variable Resistance of RMS to Interferon γ Signaling; ISRN Oncology; Volume 2012; Artikel ID 789152

Simon-Keller K, Barth S, Vincent A, Marx A; Targeting the foetal acetylcholine receptor in rhabdomyosarcoma; Expert Opinion on Therapeutic Targets; *accepted subject to minor revision*

Simon-Keller K, Paschen A, Hombach AA, Ströbel P, Coindre JM, Eichmüller SB, Vincent A, Gattenlöhner S, Hoppe F, Leuschner I, Stegmaier S, Koscielniak E, Leverkus M, Abken H, Marx A; Lack of costimulatory B7 family members and overexpression of anti-apoptotic proteins in rhabdomyosarcoma: functional relevance for T cell-based immunotherapy; *under revision*

Posterpräsentationen:

Simon-Keller K, Paschen A, Hombach AA, Stöbel P, Coindre JM, Eichmüller S, Gattenlöhner S, Leuschner I, Koscielniak E, Vincent A, Abken H, Marx A; Survivin blockade improves *in vitro* immuno-therapy of rhabdomyosarcoma by fetal acetylcholine receptor specific chimeric T-cells; 16th CTOS annual meeting; Paris 2010.

Vorträge:

Simon-Keller K, Marx A; Adoptive Immunoresponse to Rhabdomyosarcoma; Workshop on Viral Vectors & Gene Therapy; Köln 2009.

Simon-Keller K, Gattenlöhner S, Hombach A, Marx A; Adoptive Immunoresponse to Rhabdomyosarcoma; 94. Jahrestagung DGP; Berlin 2010.

Simon-Keller K, Kalbacher H, Böcker U, Ströbel P, Marx A; Influence of Interferon gamma on survival of RMS; 95. Jahrestagung DGP; Leipzig 2011.

Simon-Keller K, Homburger A, Ströbel P, Marx A; RMS cell lines and RMS biopsies share critical cell surface molecules with impact on the killing efficiency of RMS-directed fetal acetylcholine receptor-specific chimeric T cells (cTCs); 95. Jahrestagung DGP; Leipzig 2011.

Simon-Keller K, Marx A; Survivin blockade sensitizes rhabdomyosarcoma cells for lysis by fetal acetylcholine receptor-redirected T cells; 2. Sarkomkonferenz; Berlin 2012

Simon-Keller K, Bohlender AL, Mößinger K, Marx A; Overexpression of co-stimulatory ICAM1 enhances killing of RMS cell lines by NKT and chimeric T cells; 96. Jahrestagung DGP; Berlin 2012.

Simon-Keller K, Marx A; Survivin blockade sensitizes rhabdomyosarcoma cells for lysis by fetal acetylcholine receptor-redirected T cells; ESF-EMBO Conference on Molecular Biology and Innovative Therapies in Sarcomas of Childhood and Adolescence; Pultusk 2012.

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt...

...Herrn Prof. Dr. Alexander Marx, der mir als mein Betreuer stets mit Rat und Tat zur Seite stand, mir dabei aber genügend Freiräume gewährte, um meine eigenen Erfahrungen zu sammeln und dessen Enthusiasmus für die Forschung mir die nötige Motivation zur Fertigstellung dieser Arbeit gegeben hat.

....Herrn Prof. Dr. Viktor Umansky für die unkomplizierte und bereitwillige Übernahme des Erstgutachtens und die damit verbundene Möglichkeit den Doktor rerum naturalium zu erlangen.

...Herrn Prof. Dr. Michael Boutros und Herr Prof. Dr. Thomas Wieland für die Bereitschaft das Amt des Prüfers bzw. Prüfungsvorsitzenden zu übernehmen.

...Herrn Prof. Dr. Hinrich Abken, Herrn Dr. Andreas Hombach und Herrn Dr. Markus Chmielewski für die ambulante Betreuung der retroviralen Transduktionen und die Unterstützung bei den Mausexperimenten.

...Herrn Prof. Dr. Sokrates Tzartos für Bereitstellung der fAChR-Antikörper, Herrn Dr. Hubert Kalbacher für die MHC-Antikörper, Herrn Prof. Dr. Martin Leverkus für das SMAC Mimetic, Herrn Prof. Dr. David Beeson für die Überlassung der AChR-Plasmide und Herrn PD Dr. Frank Mombach für das CD54-Plasmid.

...Miriam Bierbaum, Anna-Lena Bohlender-Willke und Katharina Mößinger, ohne deren bereitwilligen Einsatz diese Arbeit von vorneherein gescheitert wäre.

...Andrea Homburger, sowohl für ihren trockenen und gleichsam erfrischenden Humor als auch die stete Bereitschaft Paraffin- und Frischgewebe-Schnitte herzustellen, wozu ich offenkundig völlig ungeeignet bin.

...Dr. Christian Sauer, Stefan Küffer, Anna-Lena Bohlender-Willke und David Fiedler für die Bereitschaft meine Arbeit Korrektur zu lesen.

...allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für all die schönen und (manchmal) auch weniger schönen Erfahrungen, die sie mit mir geteilt haben und durch deren stete Diskussionsbereitschaft ich sowohl im Leben, als auch Beruf viel lernen konnte.

...dem Tumorzentrum Heidelberg und der deutschen Krebshilfe für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes.

*Mein **besonderer Dank** gilt außerdem...*

...Anna-Lena Bohlender-Willke, Katharina Mößinger und Sabine Wolf, für die gemeinsamen Mittagspausen und Teestunden sowie die schönen Kinoabende, in denen wir uns über Gott und die Welt austauschen konnten und die eine willkommene Abwechslung im Laboralltag waren.

...meiner gesamten Familie und „Schwieger“-Familie, für ihr Verständnis, ihre Geduld und Unterstützung und das Gefühl mit den kleinen und großen Problemen des Lebens nicht alleine zu sein.

...meinen Brüdern Hans-Kai und Florian Benjamin Simon, für das nötige Durchsetzungsvermögen und die vielen andere großen und kleinen Dinge, die man nur mit Geschwistern teilen kann.

...meinen Eltern Christine und Hans Simon, die meine Wünsche und Träume von Geburt an respektiert, mich bei deren Erfüllung immer unterstützt haben und die mich stets bestärkt haben nur mein Bestes zu geben.

Die Fertigstellung dieser Arbeit ist aber in besonderer Weise meinem Mann, Markus Keller, zu verdanken, der während der gesamten Zeit mit mir gelitten, „geforscht“, gekämpft, geweint und gelacht hat und der es mit seiner nüchternen und unkomplizierten Art immer verstanden hat mich fest auf dem Boden der Tatsachen zu verankern, während seine Liebe Dinge für mich möglich gemacht hat, die sonst unmöglich gewesen wären.